

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0691-12

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250314

基于复方胃炎合剂治疗慢性萎缩性胃炎作用机制的网络药理学和分子对接分析

王秋月, 杨正宁, 黄晓峰, 黄铭涵, 王文荣

(福建中医药大学附属第二人民医院脾胃病科, 福建 福州 350003)

[摘要] **目的:** 探讨复方胃炎合剂 (CGM) 治疗慢性萎缩性胃炎 (CAG) 的活性成分和作用靶点, 联合分子对接分析和细胞实验验证其潜在机制。**方法:** 从中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 和 Swiss Target Prediction 数据库筛选 CGM 的药物活性成分, 获取各药物成分相应的靶点。采用 GeneCards 和人类在线孟德尔遗传 (OMIM) 数据库筛选 CAG 对应的靶点。于 Venny2.1.0 网络平台中获取 CGM 与 CAG 的共同靶点, 采用 STRING 在线平台对“药物-疾病”的共同靶点构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络, 并筛选核心靶点。采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建药物成分-疾病-靶点网络, 并筛选药物核心成分。采用基因本体论 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析 CGM 与 CAG 的共同靶点, AutoDock 分析软件对预测的药物主要成分与核心靶点进行分子对接分析。采用脂多糖 (LPS) 诱导胃黏膜上皮细胞 GES-1, 构建 CAG 细胞模型。将 GES-1 细胞分为空白组 (10% 血清完全培养基)、模型组 (10 mg·L⁻¹ LPS) 和不同浓度 CGM 组 (50、100、200、400、800 和 1 600 g·L⁻¹ CGM+10 mg·L⁻¹ LPS), 共培育 12、24 和 48 h, 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测各组 GES-1 细胞增殖活性。将 GES-1 细胞分为空白组 (10% 血清完全培养基)、模型组 (10 mg·L⁻¹ LPS) 和 CGM 组 (1 600 g·L⁻¹ CGM+10 mg·L⁻¹ LPS), 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组 GES-1 细胞中白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、IL-1 β 和表皮生长因子受体 (EGFR) mRNA 表达水平。**结果:** 筛选获得 CGM 成分 198 个, 与 CAG 共有的靶点 128 个。CGM 治疗 CAG 的药物成分主要为槲皮素、山柰酚和木犀草素, 主要作用于 IL-6、TNF、AKT1、IL-1 β 和 EGFR 等靶点。GO 功能富集分析, 排名前 15 位靶点主要集中于细胞凋亡、炎症反应和细胞增殖等生物学过程 (BP), 主要包括细胞质、细胞表面和大分子复合体等细胞组分 (CC), 主要发挥蛋白质、酶和泛素蛋白连接酶等分子功能 (MF)。KEGG 信号通路富集共获得 158 条通路, 主要涉及癌症相关的通路、TNF 信号通路、病毒感染、程度性细胞死亡受体-配体 1 (PD-L1) /程度性细胞死亡受体 1 (PD-1) 通路、细胞凋亡、NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路、EGFR 和 IL-17 信号通路等。关键靶点 IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1 和 EGFR 与药物核心成分槲皮素、山柰酚和木犀草素的结合能均 < -5 kcal·mol⁻¹。CCK-8 法检测, 与空白组比较, 细胞培养 24 和 48 h 后, 模型组细胞增殖活性均明显降低 ($P < 0.01$), 且 48 h 后细胞增殖活性抑制更明显, 因此选择 LPS 诱导 48 h 为造模时间; 与模型组比较, 800 和 1 600 g·L⁻¹ GCM 组细胞增殖活性均明显升高 ($P < 0.01$), 1 600 g·L⁻¹ GCM 组细胞增殖活性促进作用更明显, 故选该药物干预浓

[收稿日期] 2024-06-04 [录用日期] 2024-08-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82174365); 福建省科技厅自然科学基金项目 (2023J01821); 中国中医科学院科技创新工程学部委员学术传承与传播专项 (CI2022E017XB)

[作者简介] 王秋月 (1996-), 女, 云南省景洪市人, 在读博士研究生, 主要从事中西医结合防治消化系统疾病方面的研究。

[通信作者] 王文荣, 副教授, 主任医师, 博士研究生导师 (E-mail: wangwenrong88@sina.com); 黄铭涵, 副教授, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: huangminghan2010@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

度进行后续实验。RT-qPCR法检测,与空白组比较,模型组细胞中IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1和EGFR mRNA表达水平均明显升高($P<0.01$);与模型组比较,CGM组细胞中IL-6、IL-1 β 、AKT1和EGFR mRNA表达水平均明显降低($P<0.01$)。**结论:** GCM可以通过槲皮素、山柰酚和木犀草素等多个药物成分,作用于IL-6、TNF、AKT1、IL-1 β 和EGFR等多个靶点蛋白,并涉及多种与“炎-癌”有关的通路,起到防治CAG的作用。

[关键词] 慢性萎缩性胃炎;复方胃炎合剂;网络药理学;分子对接分析;实验验证

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A

Network pharmacology and molecular docking analysis based on mechanism of Compound Gastritis Mixture in treatment of chronic atrophic gastritis

WANG Qiuyue, YANG Zhengning, HUANG Xiaofeng, HUANG Minghan, WANG Wenrong
(Department of Spleen and Gastroenterology, Second Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the active ingredients and targets of Compound Gastritis Mixture (CGM) in the treatment of chronic atrophic gastritis (CAG) by network pharmacology method, and to validate the potential mechanism combined with molecular docking technology and cellular experiments. **Methods:** The Traditional Chinese Medicine System Analysis Platform (TCMSP) and Swiss Target Prediction databases were used to select the herbal ingredients of CGM and the corresponding targets; the GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database were used to screen the targets of CAG; the common targets of CGM and CAG were analyzed from the Venny2.1.0 platform; STRING online platform was used to construct protein-protein interaction (PPI) networks for common drug-disease targets and screen the core targets. Cytoscape 3.9.1 software was used to construct the drug-disease-target network and screen the drug core components; Gene Ontology (GO) functional, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were used to analyze the common targets of CGM and CAG; and AutoDock analysis software was used to perform molecular docking analysis of predicted main components of the drugs and core targets. The gastric mucosal epithelial cells GES-1 were induced by lipopolysaccharide (LPS) to construct CAG cell model. The GES-1 cells were divided into blank group (10% serum complete medium), model group (10 mg·L⁻¹ LPS), and different concentrations of CGM groups (50, 100, 200, 400, 800 and 1 600 g·L⁻¹ CGM+10 mg·L⁻¹ LPS), and cells were incubated for 12, 24, and 48 h. The cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the proliferation activities of GES-1 cells. The GES-1 cells were divided into blank group (10% serum complete medium), model group (10 mg·L⁻¹ LPS) and CGM group (1 600 g·L⁻¹ CGM+10 mg·L⁻¹ LPS). Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF), serine/threonine protein kinase 1 (AKT1), IL-1 β , and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA in the cells in various groups. **Results:** A total of 198 ingredients of CGM were screened, and 128 common targets with CAG were identified. The main herbal ingredients of CGM in treatment of CAG were quercetin, kaempferol, and luteolin, which mainly acted on the core targets of IL-6, TNF, AKT1, IL-1 β , and EGFR. The GO function enrichment analysis results showed that the top 15 targets mainly focused on biological processes (BP) such as apoptosis, inflammatory response and cell proliferation, mainly included cellular components (CC) such as cytoplasm, cell surface and macromolecular complexes, and mainly exerted molecular functions (MF) such as proteins, enzymes

and ubiquitin-protein ligases. A total of 158 pathways were obtained from KEGG signaling pathway enrichment analysis, mainly involved cancer-related pathways, TNF signaling pathways, viral infection, programmed cell death-ligand 1(PD-L1)/ programmed cell death protein-1 (PD-1) pathways, apoptosis, NOD-like receptor signaling pathways, Toll-like receptor signaling pathways, EGFR, and IL-17 signaling pathways. The binding energies of the core targets IL-6, TNF, IL-1 β , AKT1, and EGFR with main herbal ingredients quercetin, kaempferol, and luteolin were $< -5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. The CCK-8 assay results showed that compared with blank group, after 24 and 48 h of cell culture, the proliferation activities of the cells in model group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the inhibition of the proliferation activity was more obvious after 48 h; therefore, 48 h was selected for the modeling time; compared with model group, the proliferation activities of cells in 800 and 1 600 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ GCM groups were significantly decreased ($P < 0.01$), and the promotion of cell proliferation activity was more obvious in 1 600 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ GCM group, so the intervening concentration of this drug was selected for the subsequent experiments. The RT-qPCR method results showed that compared with blank group, the expression levels of IL-6, TNF, IL-1 β , AKT1, and EGFR mRNA in the cells in model group were significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the expression levels of IL-6, IL-1 β , AKT1 and EGFR mRNA in the cells in CGM group were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** CGM may play a role in the prevention and treatment of CAG through multiple ingredients such as quercetin, kaempferol and lignocerosol, acting on the multiple target proteins such as IL-6, TNF, AKT1, IL-1 β , and EGFR, as well as involving a variety of "inflammatory-cancer-related" pathways.

KEYWORDS Chronic atrophic gastritis; Compound Gastritis Mixture; Network pharmacology; Molecular docking analysis; Experiment verification

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 在人群中普遍存在, 其无特异性的临床症状, 胃黏膜组织病理以固有腺体萎缩和减少为主^[1]。CAG被认为是一种慢性炎症性感染疾病, 其病程长, 若不及早干预治疗, 易出现胃黏膜和肠上皮的化生异常发育, 向异型增生等胃癌前病变进展, 增加其癌变概率^[2], 因此积极防治CAG具有重要意义。近年来, 中医药应用于CAG的治疗得到较多关注, 研究^[3]表明: 中医药可通过减轻炎症、对抗幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)、调控细胞增殖和凋亡及促进胃酸分泌等多种过程, 改善CAG的黏膜病变。复方胃炎合剂 (compound gastritis mixture, CGM) 是在国医大师杨春波教授多年学术思想引领下, 结合临床证素辨证调查, 进一步优化的协定方, 常应用于CAG的临床治疗, 包含党参、黄芪、茯苓、白术、砂仁、半夏、陈皮、佩兰、三七、黄连、莪术、枳壳、白芍和甘草14味药, 具有健脾益气、清热化湿及化瘀舒络的作用^[4-5]。研究^[5]显示: CGM治疗CAG患者临床疗效明显, 不良反应少。研究^[6-7]显示: 该方能够减轻CAG大鼠胃黏膜炎症反应, 阻断其黏膜病理的恶性变化。但CGM作为多种中药组

成的复方制剂, 存在多靶点和多机制的作用特点, 因此, 对于CGM治疗CAG的作用机制还应进行全面和多层次的深入探讨, 以便更细致地说明该方在CAG治疗领域的适用性。网络药理学研究方法可从系统、整体的角度, 探讨中药复方治疗疾病的潜在分子靶点, 并可结合分子对接分析进行初步验证, 为阐明中药复方的复杂作用机制提供重要的技术支撑和科学依据^[8]。本研究采用网络药理学方法, 系统性地分析CGM在治疗CAG时发挥作用的主要药物成分和涉及的靶点及信号通路, 联合分子对接分析和细胞实验对预测的结果进行验证, 以阐明CGM治疗CAG的潜在作用机制, 并为其治疗CAG的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 CGM药物活性成分和靶点预测 在中药系统药理数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine System Analysis Platform, TCMSP) 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)^[9] 中输入药名“党参、黄芪、茯苓、白术、砂仁、半夏、陈皮、佩兰、三七、黄连、莪术、枳壳、白芍、甘草”, 搜索各药物的活性成分, 并以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 进行筛选。在PubChem

数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[10] 中搜索各药物成分的“SMILES”格式,通过 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)^[11] 预测相应的药物靶点,选择可靠度 ≥ 0.1 ,经过相应合并和去重,最终获得CGM的药物靶点。

1.2 CAG 疾病靶点预测 分别在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[12] 和人类在线孟德尔遗传 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 数据库 (<https://omim.org/>)^[13] 输入疾病名称“chronic atrophic gastritis”,搜索疾病的靶点,其中 GeneCards 中选择“score>中位数”的结果,最后将2种数据库获得的结果进行合并,删除重复靶点。

1.3 药物-疾病共同靶点预测 在 Venny2.1.0 网络平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 获取CGM与CAG二者间的共同靶点,并绘制韦恩图。

1.4 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 在 STRING 在线平台 (<https://cn.string-db.org/>)^[14] 中对药物-疾病的共同靶点进行PPI网络创建,“Homo sapiens”为生物种类,置信度为 >0.4 。采用 Cytoscape 3.9.1 软件^[15] 将PPI网络图进行可视化,应用拓扑分析方法计算度中心性 (degree centrality, DC) 等参数,筛选核心靶点。

1.5 药物成分-疾病-靶点网络图构建 采用 Cytoscape 3.9.1 软件^[15] 构建药物成分-疾病-靶点网络,根据拓扑参数DC值选取CGM中发挥作用的的核心成分。

1.6 基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析

将CGM与CAG的共同靶点输入至 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)^[16],进行GO功能和KEGG信号通路富集分析,分别获取排名前15位GO功能富集分析和前30位KEGG信号通路富集分析的靶点,采用微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行图像可视化。

1.7 分子对接分析 采用 AutoDockTools (Version 1.5.7) 软件,将DC值排名前3位的药物成分与排名前5位的作用靶点构建分子对接模型,采用 Autodock Vina 软件评估二者间的结合潜

力^[17]。结合能越低,提示结合活性越高且构象越稳定,结合能 $< -5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表明结合良好。最后,通过 PyMOL (Version 2.5.4) 软件将对接结果可视化。

1.8 细胞、药物、主要试剂和仪器 胃黏膜上皮细胞 GES-1 购于上海沪震实业有限公司。CGM 药液:党参 15 g、黄芪 15 g、白术 10 g、茯苓 15 g、半夏 9 g、佩兰 9 g、陈皮 9 g、砂仁 6 g、枳壳 10 g、莪术 6 g、三七 3 g、黄连 3 g、白芍 9 g 和甘草 3 g,均由福建中医药大学附属第二人民医院提供。取上述各药物的10倍剂量,并将其浸泡于8倍剂量的水中0.5 h,依次煎煮1.5、1.0和0.5 h,再将3次煎煮的药液进行合并、过滤后浓缩至其生药含量为 $1\ 600 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,冷藏于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 购自北京索莱宝公司,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1 (serine/threonine kinase protein 1, AKT1)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和 IL-1 β 抗体均购自英国 Abcam 公司,细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂,TRIzol、SYBR Green PCR 试剂盒和逆转录试剂盒均购自上海赛默飞世尔科技有限公司。酶标分析仪购自北京普朗新技术有限公司,显微镜购自上海蔡康光学仪器有限公司,实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 检测仪购自美国 ABI 公司,低温冷冻离心机购自上海卢湘仪实验仪器有限公司。

1.9 CCK-8 法检测各组 GES-1 细胞增殖活性

GES-1 细胞采用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素双抗混合液的 DMEM 高糖培养基、于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。选择处于对数生长期的细胞,于96孔细胞培养板中接种培养,每组各3个复孔,各孔细胞计数 5×10^3 个,至细胞融合度约80%,将GES-1细胞分为空白组(10%血清完全培养基)、模型组($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS)和不同浓度CGM组(50、100、200、400、800和 $1\ 600 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CGM+ $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS),共培育12、24和48 h后,于各孔中加入配制好的CCK-8试剂 $100 \mu\text{L}$,培养箱中再培育1 h。采用酶标仪于波长450 nm处检测吸光度(A)值,以A值代表各组细胞增殖活性,筛选最佳药物浓度和作用时间。

1.10 RT-qPCR法检测各组 GES-1 细胞中 IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1 和 EGFR mRNA 表达水平 按照“1.9”中方法培养各组 GES-1 细胞, 选择对数生长期 GES-1 细胞接种于 96 孔细胞培养板中培养 24 h, 将 GES-1 细胞分为空白组 (10% 血清完全培养基)、模型组 (10 mg·L⁻¹ LPS) 和 CGM 组 (1 600 g·L⁻¹ CGM+10 mg·L⁻¹ LPS), 收集各组细胞, 依据 SYBR Green PCR 试剂盒说明书进行

PCR 扩增, 于冰上融化, 反应体系: SYBRGreen Mix 12.5 μ L、上游引物和下游引物各 0.5 μ L、cDNA 模板 2 μ L 和 ddH₂O 9.5 μ L, 于冰上操作。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 40 个循环。分析溶解曲线, 以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因表达水平。引物序列见表 1, PCR 引物由复耕生物科技 (上海) 有限公司合成。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
IL-6	TCCAGAACAGATTTGAGAGTAGTG	GCATTTGTGGTTGGGTCAGG
TNF	CGGGATCCGAAATTGACACAAGTGGACC	CGGAATTCCTCCCAAATAAATACATTCATCTG
AKT1	CAACTTCTCTGTGGCGCAGTG	GACAGGTGGAAGAACAGCTCG
IL-1 β	CCAGGGACAGGATATGGAGCA	TTCAACCGCAGGACAGGTACAG
EGFR	GGCACTTTTGAAGATCATTTTCTC	CTGTGTTGAGGGCAATGAG
GAPDH	TATCATGCGTTCTCCTCAGA	TTTGAAGGCAGTCTGTTCGTA

1.11 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计学分析。各组 GES-1 细胞增殖活性和细胞中 IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1 及 EGFR mRNA 表达水平符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGM 的药物活性成分及相应的靶点 通过检索获得 CGM 的药物活性成分, 并删除无作用靶点的药物成分, 去除重复, 最后获得 198 个药物成分, 1 120 个对应靶点, 共包含 19 个药物共同活性成分。见表 2。

2.2 CAG 疾病靶点及其与 CGM 的共同靶点 采用 GeneCards 和 OMIM 数据库检索 CAG 疾病相关的作用靶点, 合并后去重获得疾病靶点共 484 个, 应用 Venny 2.1.0 网站将其与 1 120 个药物成分靶点取交集, 获取 128 个 CGM 与 CAG 的共同靶点。见图 1。

2.3 PPI 网络 将 128 个 CGM 与 CAG 的共同靶点导入 STRING 在线平台, 去除游离节点后, 获得 PPI 网络图, 再将其导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行图像可视化和拓扑分析。共包括 128 个节点, 2 848 条连接线, 各节点的圆圈越大且颜色越红代表其对应

的 DC 值越高。获得排名前 10 位的核心靶点, 包括 IL-6、TNF、AKT1、IL-1 β 、EGFR、TP53、B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl2)、核因子 KB1 (nuclear factor-KB1, NFKB1)、信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3) 和 SRC, 相关靶点可能是 CGM 治疗 CAG 的重要靶点。见图 2。

2.4 药物成分-疾病-靶点网络图 药物成分-疾病-靶点网络显示出 328 个节点, 2 638 条连接线, 右侧下方正方形为共同作用靶点, 右侧上方菱形为疾病名称, 左侧圆形为药物成分, 左侧六边形为药物名称。计算每个节点的 DC 值, 排名前 3 位的成分为槲皮素、山柰酚和木犀草素, 此 3 种药物成分可能为 CGM 治疗 CAG 的主要药物成分。见图 3。

2.5 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析 将筛选获取的 128 个共同靶点输入至 DAVID 数据库中, 共获得 1 048 个 GO 功能富集分析结果, 包含 831 个生物学过程 (biological process, BP)、76 个细胞组分 (cellular component, CC) 和 141 个分子功能 (molecular function, MF)。对排名前 15 位靶点进行 GO 功能富集分析, 主要集中于细胞凋亡、炎症反应和细胞增殖等 BP, 主要包括细胞质、细胞表面和大分子复合体等 CC, 主要发挥蛋白质、酶和泛素蛋白连接酶等 MF。KEGG 信号通路富集共获得 158 条通路, 可视化排名前 30 位的通路, 主要涉

表2 CGM药物共同活性成分
Tab. 2 Common active ingredients of CGM herbs

MOLID	Common active ingredient	CGM herbs
MOL000296	Hederagenin	Huangqi, Fulin, Ezhu
MOL000033	(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10, 13-dimethyl-17-[(2R, 5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	Huangqi, Baizhu
MOL000449	Stigmasterol	Dangshen, Peilan, Sharen, Banxia, Sanqi
MOL000006	Luteolin	Dangshen, Peilan
MOL007514	Methyl icoso-11, 14-dienoate	Dangshen, Sharen
MOL001755	24-Ethylcholest-4-en-3-one	Banxia, Sharen
MOL000358	Seta-sitosterol	Sanqi, Banxia, Sharen, Zhike, Baishao
MOL000359	Sitosterol	Chenpi, Peilan, Baishao, Gancao
MOL002879	Diop	Sanqi, Dangshen
MOL000098	Quercetin	Huangqi, Sanqi, Huanglian, Gancao
MOL001792	DFV	Sanqi, Gancao
MOL003896	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	Dangshen, Gancao
MOL004328	Naringenin	
MOL005828	Nobiletin	Chenpi, Zhike
MOL000239	Jaranol	
MOL000354	Isorhamnetin	Huangqi, Gancao
MOL000417	Calycosin	
MOL000211	Mairin	
MOL000422	kaempferol	Huangqi, Baishao, Gancao

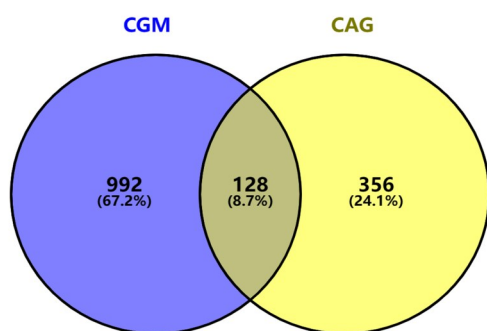


图1 CGM药物与CAG共同靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of targets between CGM herbs and CAG

及癌症相关的通路、TNF信号通路、病毒感染、程序性细胞死亡受体配体1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1) /程序性细胞死亡受体1 (programmed cell death protein-1, PD-1) 通路、细胞凋亡、NOD样受体信号通路、Toll受体信号通路、EGFR和IL-17信号通路等。见图4。

2.6 分子对接分析 各靶点IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1和EGFR与药物成分槲皮素、山柰酚及木犀草素的结合能均 $< -5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，表明所选活性

成分与靶蛋白之间的结合良好。见表3和图5。

2.7 各组细胞增殖活性 与空白组比较，细胞培养24和48 h后，模型组细胞增殖活性均明显降低 ($P < 0.01$)，且48 h后细胞增殖活性抑制更明显，因此选择LPS诱导48 h为造模时间。见图6。与模型组比较，800和1 600 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CGM组细胞增殖活性均明显升高 ($P < 0.01$)，1 600 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ GCM组细胞增殖活性促进作用更明显，故选择该药物干预浓度进行后续实验。见图7。

2.8 各组细胞中IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1和EGFR mRNA表达水平 与空白组比较，模型组细胞中IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1和EGFR mRNA表达水平均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，CGM组细胞中IL-6、IL-1 β 、AKT1和EGFR mRNA表达水平均明显降低 ($P < 0.01$)；TNF mRNA表达水平降低，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表4。

3 讨论

CAG作为一种胃黏膜癌前状态，及早干预治疗或可逆转其黏膜萎缩的病理改变，有助于防治胃癌的发生^[1]。多年来福建中医药大学附属第二人民

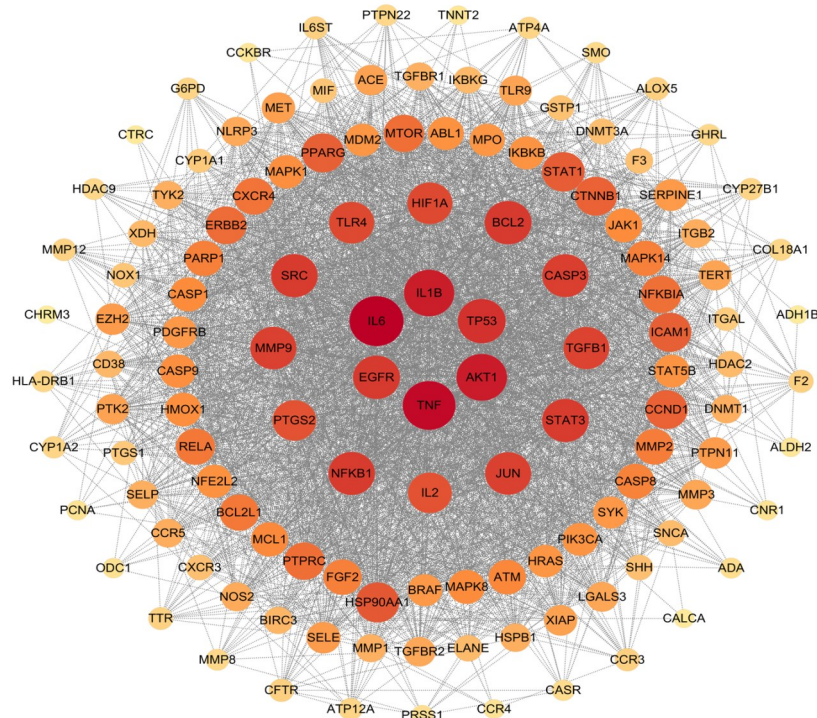


图2 CGM治疗CAG潜在靶点的PPI网络图

Fig. 2 PPI network diagram of potential targets of CGM in treatment of CAG

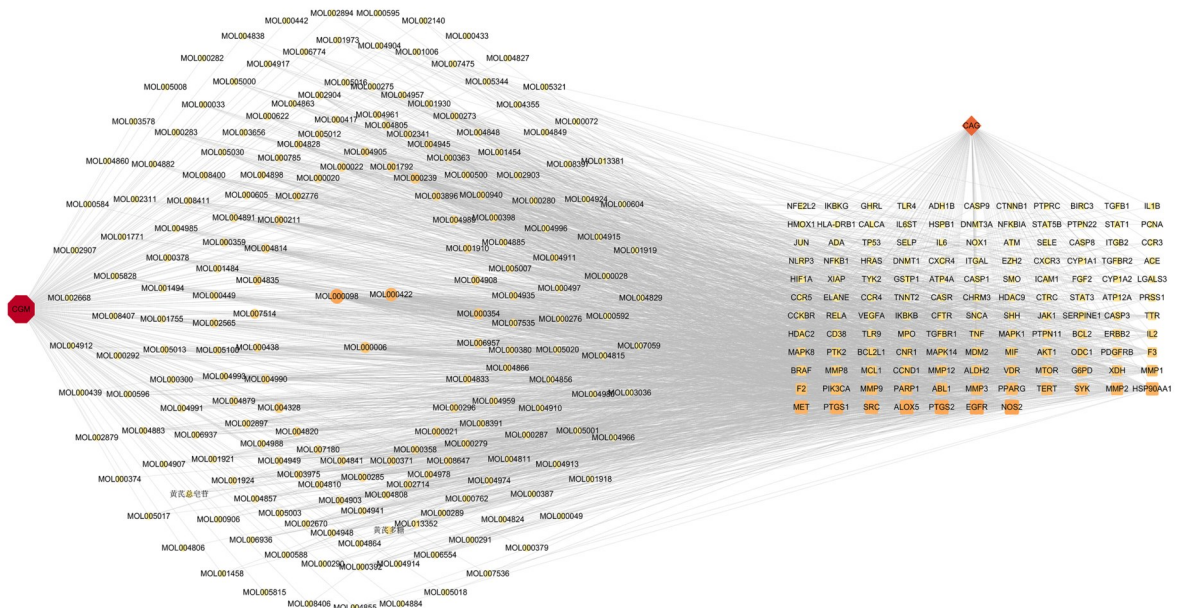
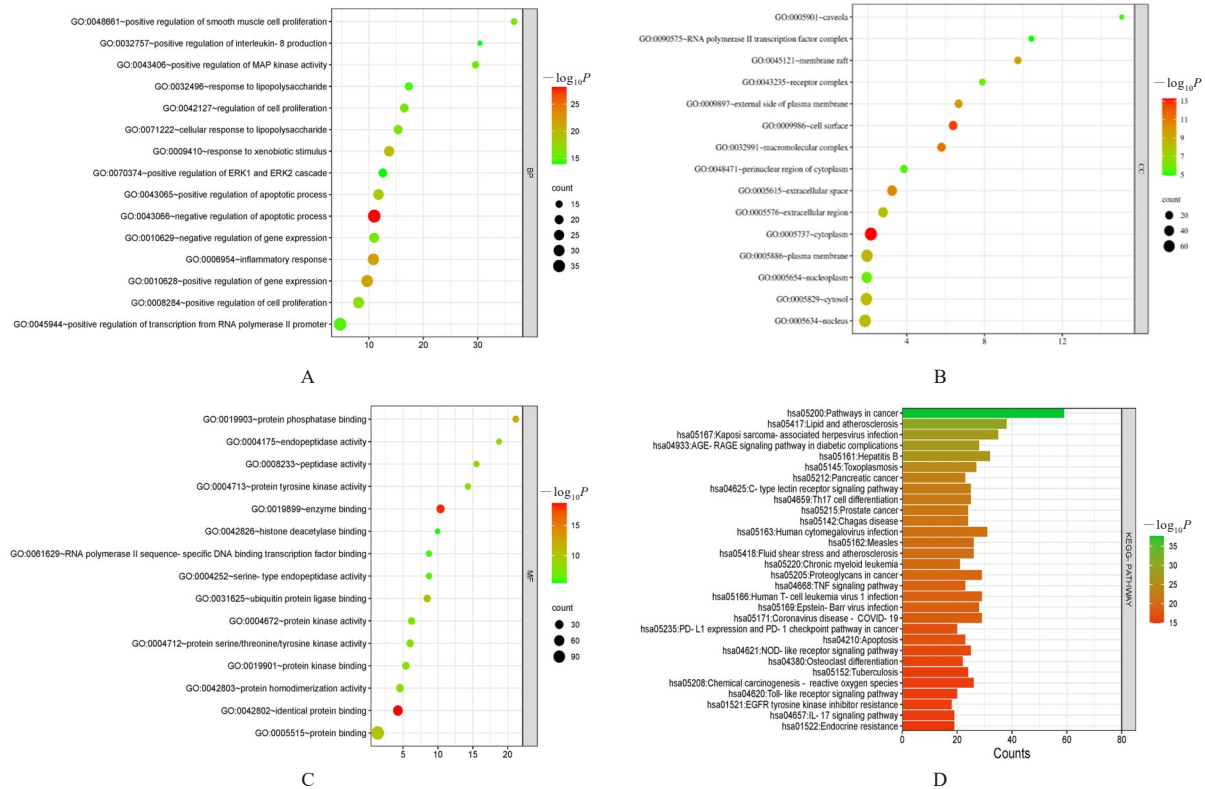


图3 药物成分-疾病-靶点网络图

Fig. 3 Network diagram of herb ingredient-disease-target

医院脾胃病科在国医大师杨春波教授主张的“脾胃湿热”相关理论的指导下, 致力于CAG等胃黏膜病变的系列研究, 且在临床诊治中取得了明显效果^[18]。结合福州本地的气候环境, 本课题组在临床辨治时发现, 多数CAG患者表现为复合证型,

其在脾胃虚弱的基础上, 常兼夹湿、热和瘀等病理因素, 加重胃络的损伤, 促进CAG的进展。CGM常被应用于脾虚湿热兼瘀证CAG患者的临床治疗中, 其方中君药党参和黄芪均可健脾益气; 臣药以炒白术增补脾胃之气、茯苓健脾渗湿; 配以佐药半



A: GO-BP; B:GO-CC; C:GO-MF; D:KEGG-pathway.

图4 GO功能和KEGG信号通路富集分析

Fig. 4 GO functional and KEGG signaling pathway enrichment analysis

表3 主要药物成分与核心靶点的分子对接分析

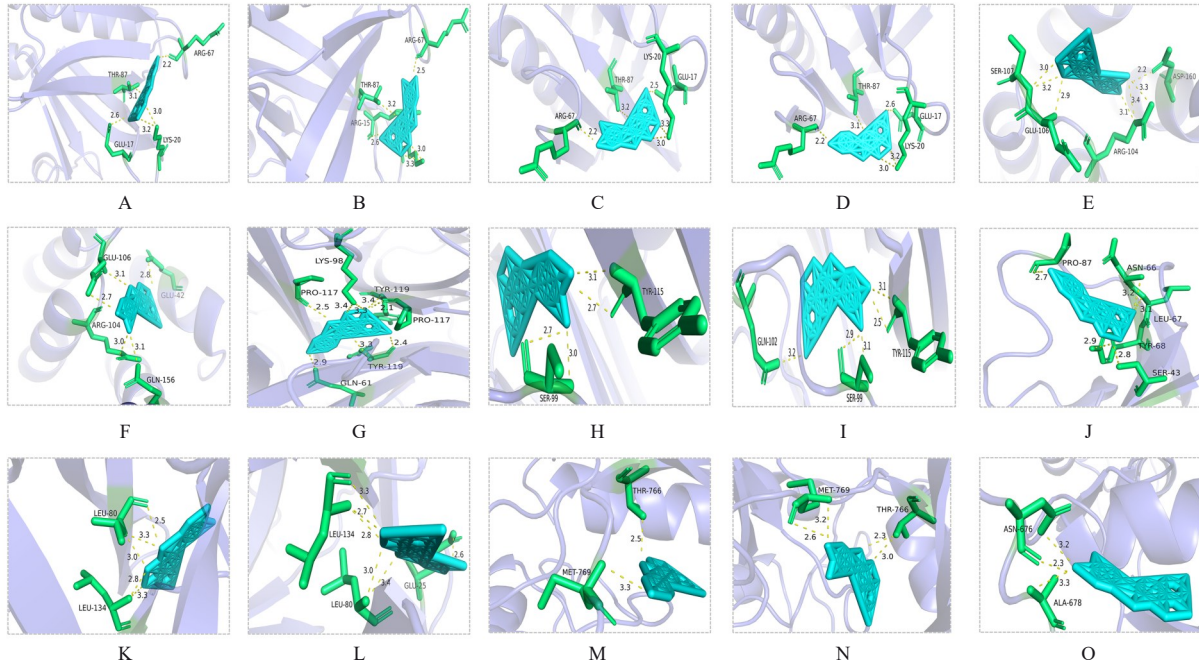
Tab. 3 Molecular docking analysis on main herb ingredients and core targets

Target	Herb ingredient	Binding energy (kcal·mol ⁻¹)
IL-6	Quercetin	-8.0
	Kaempferol	-7.7
	Luteolin	-8.0
TNF	Quercetin	-10.1
	Kaempferol	-10.9
	Luteolin	-9.7
AKT1	Quercetin	-8.4
	Kaempferol	-8.1
	Luteolin	-8.3
IL-1 β	Quercetin	-8.0
	Kaempferol	-8.1
	Luteolin	-8.0
EGFR	Quercetin	-7.9
	Kaempferol	-8.4
	Luteolin	-8.3

夏、佩兰、陈皮、砂仁行气燥湿兼和胃，莪术、枳壳消积散瘀，三七化瘀通络，黄连清热燥湿，白芍

酸甘养阴，防止过用温燥之品而有损阴液；使药甘草，可调和诸药，本方药物配伍，以期分化湿热而恢复脾胃健运之功，兼顾逐瘀通络，进而逆转CAG等胃黏膜病变，以防止其进一步癌变^[5]。然而，CGM治疗CAG的具体分子机制尚有待进一步探讨。

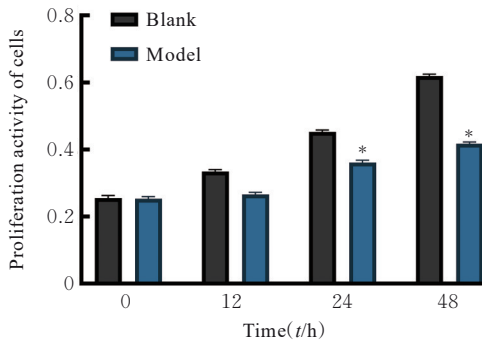
CGM方中共有198个主要活性成分，可作用于128个对应的靶点蛋白进而达到治疗CAG的目的。经分析预测得出槲皮素、山柰酚和木犀草素为其中的重要药物成分。研究^[19-20]显示：槲皮素强大的抗氧化活性可直接清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)，进而改善胃黏膜的氧化损伤，还可降低TNF- α 诱导的基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)表达，减轻胃黏膜上皮细胞炎症反应及阻断细胞迁移。山柰酚可抑制促炎因子IL-6和促进抗炎因子IL-10的分泌，也可增加过氧化氢酶(catalase, CAT)水平以对抗氧化应激，进而修复胃黏膜的损伤^[21]。木犀草素可通过激活细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡或抑制上皮-间充质转化等过程，阻断癌变的进



A: AKT1-kaempferol; B: AKT1-luteolin; C: AKT1-quercetin; D: IL-6-kaempferol; E: IL-6-luteolin; F: IL-6-quercetin; G: TNF-kaempferol; H: TNF-luteolin; I: TNF-quercetin; J: IL-1 β -kaempferol; K: IL-1 β -luteolin; L: IL-1 β -quercetin; M: EGFR-kaempferol; N: EGFR-luteolin; O: EGFR-quercetin.

图5 分子对接模式图

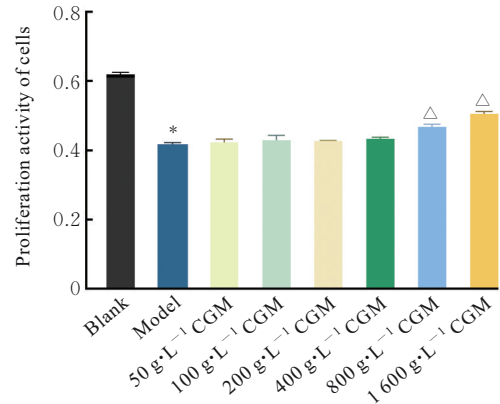
Fig. 5 Model diagrams of molecular docking



* $P < 0.01$ vs blank group.

图6 培养不同时间2组细胞增殖活性

Fig. 6 Proliferation activities of cells in two groups after cultured for different time



* $P < 0.01$ vs blank group; $\Delta P < 0.01$ vs model group.

图7 各组GES-1细胞增殖活性

Fig. 7 Proliferation activities of GES-1 cells in various groups

展^[22];同时,木犀草素在有效根除Hp感染方面也具有一定的潜力^[23]。

对128个共同靶点进行PPI网络分析,依据DC值推测IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1和EGFR为CGM作用于CAG的核心靶点。CAG发生发展过程中伴有多种促炎细胞因子的释放,包括TNF- α 、IL-1 β 和IL-6,均对胃黏膜病变的产生有重要调节作用。IL-6参与多种炎症反应过程,通过信号受体亚基糖蛋白130调节细胞增殖、存活和血管生成

等,被认为是连接“炎-癌”之间的重要介质^[24]。TNF与IL-6具有基因多态性,与胃肠道Hp感染相关性疾病有密切联系^[25];同时,TNF作为细胞调节因子,可促进IL-1 β 和IL-6等炎性细胞因子释放,加剧CAG的黏膜炎性损伤^[26]。IL-1 β 不仅参与胃黏膜炎症反应,还可调节胃酸分泌,同时其表达增强也可能增加Hp感染的风险^[27]。AKT1作为丝氨酸苏氨酸激酶之一,可激活与其相关的磷脂酰

表4 各组细胞中IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1和EGFR mRNA表达水平Tab. 4 Expression levels of IL-6, TNF, IL-1 β , AKT1, and EGFR mRNA in cells in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	IL-6 mRNA	TNF mRNA	AKT1 mRNA	IL-1 β mRNA	EGFR mRNA
Blank	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.23	1.00 \pm 0.18	1.00 \pm 0.21	1.00 \pm 0.21
Model	3.64 \pm 0.75*	2.19 \pm 0.26*	3.78 \pm 0.67*	5.72 \pm 0.66*	5.72 \pm 0.66*
CGM	1.94 \pm 0.57 Δ	1.79 \pm 0.19	1.96 \pm 0.20 Δ	1.84 \pm 0.63 Δ	2.21 \pm 0.72 Δ

* $P<0.01$ vs blank group; $\Delta P<0.01$ vs model group.

肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K) /AKT 通路, 降低抑癌因子人第 10 号染色体缺失的磷酸酶 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom ten, PTEN) 的表达及自噬活性, 进而诱导 CAG 发生^[28]。EGFR 为表皮生长因子受体, 可促进 *Hp* 诱导的胃上皮细胞的 DNA 损伤^[29]; 同时, EGFR 表达水平升高可激活其介导的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK)、Janus 激酶 (Janus kinase 1, JAK1) /STAT1 通路, 促进胃上皮细胞的异常增殖、凋亡和分化, 增加癌变风险^[30-31]。

GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析结果显示: CGM 除参与 TNF 和 EGFR 信号通路, 还可涉及与癌症相关、PD-1/PD-L1、NOD 样受体、Toll 样受体和 IL-17 等多条信号通路, 调节细胞凋亡、分化、炎症和癌症等病变异常进展的多种生物学过程。研究^[32]显示: PD-1/PD-L1 为程序性细胞死亡的相关通路, 已被证实在癌症过程中具有重要作用, 该通路的激活可通过诱导 T 淋巴细胞的凋亡进而抑制免疫反应, 促进癌细胞的免疫逃逸, 利于肿瘤微环境的形成。Toll 样受体和 NOD 样受体均为模式识别受体, 当暴露于不同的病原体成分时可激活细胞内信号传导的级联反应, 诱导慢性炎症和细胞焦亡的发生, 与 CAG 的发生发展产生紧密联系^[33-34]。IL-17 可影响组织炎症和黏膜损伤, 同时 IL-17 在胃癌组织中高表达, 其信号传导通过激活自噬过程而诱导胃癌细胞的自我更新, 与癌细胞的分化能力关系密切^[35]。提示 CGM 改善或延缓 CAG 进展的作用机制多涉及“炎-癌”相关的多条信号通路和多种生物过程。

本研究结果显示: 关键靶蛋白 IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1 和 EGFR 与药物成分槲皮素、山柰酚和木犀草素之间均可稳定结合。采用 LPS 诱导 GES-1 细胞, 构建 CAG 细胞模型进一步行体外实

验验证, 结果显示: CGM 可提高 LPS 抑制的 GES-1 细胞增殖活性, 同时降低胃炎细胞中 IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1 和 EGFR mRNA 表达水平, 抑制 CAG 病变细胞的异常增殖。提示分子对接分析及细胞实验的验证结果与网络药理学预测的结果一致。然而, 由于中药复方制剂的复杂性与网络信息分析技术的局限性, 本研究无法概括 CGM 治疗 CAG 完整的药理作用。因此, 未来仍需更多的实验研究进行深入探索。

综上所述, CGM 可通过槲皮素、山柰酚和木犀草素等多种药物成分, 作用于 IL-6、TNF、IL-1 β 、AKT1 和 EGFR 等靶蛋白, 参与 TNF 和 EGFR 等多种信号通路以调控炎症反应、癌细胞的增殖及凋亡等过程, 发挥治疗 CAG 的作用。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王秋月参与实验设计和实施、数据采集和统计学分析及论文撰写, 杨正宁参与数据采集, 黄晓峰参与实验技术指导, 黄铭涵和王文荣参与实验设计及论文审核。

[参考文献]

- [1] 国家消化系疾病临床医学研究中心(上海), 国家消化道早癌防治中心联盟, 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组等. 中国胃黏膜癌前状态和癌前病变的处理策略专家共识(2020年)[J]. 中华消化杂志, 2020, 40(11): 731-741.
- [2] LAHNER E, ZAGARI R M, ZULLO A, et al. Chronic atrophic gastritis: natural history, diagnosis and therapeutic management. A position paper by the Italian Society of Hospital Gastroenterologists and Digestive Endoscopists [AIGO], the Italian Society of Digestive Endoscopy [SIED], the Italian Society of Gastroenterology [SIGE], and the Italian Society of Internal Medicine [SIMI][J]. Dig Liver Dis, 2019, 51(12): 1621-1632.
- [3] 王思慈, 李园, 李萍, 等. 中医药治疗慢性萎缩性

- 胃炎的多途径作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(19): 193-202.
- [4] 林平, 黄小燕, 施婧瑶, 等. 慢性胃炎的证素特点[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(2): 7-9.
- [5] 黄铭涵, 黄健, 李思汉, 等. 复方胃炎合剂逆转胃癌前病变的临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(4): 20-23.
- [6] 田琳, 黄铭涵, 李思汉, 等. 从JAK1/STAT3信号通路探讨复方胃炎合剂抑制慢性萎缩性胃炎进展的分子机制[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(9): 37-40.
- [7] 黄铭涵, 李思汉, 田琳, 等. 基于Sonic Hedgehog通路探讨复方胃炎合剂干预慢性萎缩性胃炎癌前病变的机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(2): 230-235.
- [8] 王子怡, 王鑫, 张岱岩, 等. 中医药网络药理学: 《指南》引领下的新时代发展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 7-17.
- [9] 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.
- [10] KIM S, CHEN J, CHENG T J, et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D1388-D1395.
- [11] DAINA A, MICHELIN 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.
- [12] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
- [13] HAMOSH A, AMBERGER J S, BOCCHINI C, et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®): victor McKusick's magnum opus[J]. Am J Med Genet A, 2021, 185(11): 3259-3265.
- [14] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [15] MAJEED A, MUKHTAR S. Protein-protein interaction network exploration using cytoscape [J]. Methods Mol Biol, 2023, 2690: 419-427.
- [16] SHERMAN B T, HAO M, QIU J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021update) [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(W1): W216-W221.
- [17] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, et al. AutoDock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings[J]. J Chem Inf Model, 2021, 61(8): 3891-3898.
- [18] 黄铭涵, 何友成, 杨正宁, 等. 国医大师杨春波辨治脾胃湿热证胃肠病经验[J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(1): 40-45.
- [19] QI W D, QI W X, XIONG D W, et al. Quercetin: its antioxidant mechanism, antibacterial properties and potential application in prevention and control of toxipathy[J]. Molecules, 2022, 27(19): 6545.
- [20] HSIEH H L, YU M C, CHENG L C, et al. Quercetin exerts anti-inflammatory effects *via* inhibiting tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in normal human gastric epithelial cells [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(11): 1139-1158.
- [21] CAMPOS-VIDAL Y, ZAMILPA A, JIMÉNEZ-FERRER E, et al. A mixture of kaempferol-3-O-sambubioside and kaempferol-3-O-sophoroside from *Malvaviscus arboreus* prevents ethanol-induced gastric inflammation, oxidative stress, and histologic changes[J]. Plants, 2022, 11(21): 2951.
- [22] IMRAN M, RAUF A, ABU-IZNEID T, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: a review[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108612.
- [23] JAFAR M, SALAHUDDIN M, KHAN M S A, et al. Preparation and *in vitro-In vivo* evaluation of luteolin loaded gastroretentive microsphere for the eradication of *Helicobacter pylori* infections[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(12): 2094.
- [24] TANIGUCHI K, KARIN M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer[J]. Semin Immunol, 2014, 26(1): 54-74.
- [25] 汤森, 赖运庆, 吴文朝. 细胞因子基因多态性及Hp感染与慢性萎缩性胃炎易感性的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(19): 2973-2977.
- [26] GONG H Y, HAN D, LUO Z C, et al. Xiangshao Decoction alleviates gastric mucosal injury through NRF2 signaling pathway and reduces neuroinflammation in gastric ulcer rats [J]. Phytomedicine, 2023, 118: 154954.
- [27] MA J J, WU D D, HU X, et al. Associations between cytokine gene polymorphisms and susceptibility to *Helicobacter pylori* infection and *Helicobacter pylori* related gastric cancer, peptic ulcer disease: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176463.
- [28] 王杰, 杜朋丽, 董佳琪, 等. 黄连碱对慢性萎缩性胃炎大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 中国实

- 验方剂学杂志, 2024, 30(18): 117-124.
- [29] CHATURVEDI R, ASIM M, PIAZUELO M B, et al. Activation of EGFR and ERBB2 by *Helicobacter pylori* results in survival of gastric epithelial cells with DNA damage[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(7): 1739-1751.
- [30] 杨玥玮, 程楠, 刘丽然, 等. 香连化浊方对慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃黏膜EGFR/MAPK/ERK信号通路的影响[J]. *中医杂志*, 2023, 64(14): 1483-1490.
- [31] 朱景茹, 黄婉仪, 洪银洁, 等. 基于EGFR/JAK1/STAT1信号通路探讨柴芍六君汤治疗慢性萎缩性胃炎肝郁脾虚证大鼠的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(7): 3334-3338.
- [32] WU M L, HUANG Q R, XIE Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 24.
- [33] 黄铭涵, 黄健, 陈琴, 等. 健脾清化中药复方对大鼠慢性萎缩性胃炎TLR4-MyD88依赖途径蛋白表达及TNF- α 的影响[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(9): 1321-1325.
- [34] 林翔英, 王鑫, 钟国栋, 等. 基于NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路探讨清化饮对慢性萎缩性胃炎大鼠胃上皮细胞焦亡的影响[J]. *实用中医内科杂志*, 2024, 38(11): 32-35.
- [35] BIE Q L, SONG H, CHEN X K, et al. IL-17B/IL-17RB signaling cascade contributes to self-renewal and tumorigenesis of cancer stem cells by regulating Beclin-1 ubiquitination[J]. *Oncogene*, 2021, 40(12): 2200-2216.