

# 基于网络药理学和细胞实验探讨蟾蜍灵治疗胃癌的作用机制

刘玉玲<sup>1,2\*</sup>, 陈利荣<sup>1</sup>, 侯艳香<sup>1</sup>, 王元森<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山西医科大学汾阳学院 医学检验系; <sup>2</sup>山西省汾阳医院肿瘤科, 汾阳 032200

**摘要:**本研究基于网络药理学、分子对接和细胞实验探究蟾蜍灵治疗胃癌的作用机制。利用 PubChem 和 PharmMapper 数据库检索蟾蜍灵的药物靶点; GeneCards 数据库收集胃癌的相关靶点, 运用 Venny 软件和 STRING 数据库构建药物与疾病共同靶点的 PPI 网络图, 通过 DAVID 数据库进行 GO 富集和 KEGG 通路分析。利用 Cytoscape3.9.0 软件进行可视化并筛选核心靶点, 通过 GIEPA 数据库、Kaplan-Meier 方法、AutoDock 和 PyMOL 软件分析核心靶点分别与胃癌和蟾蜍灵之间的关系。最后通过细胞实验对网络药理学预测的靶点和信号通路进行实验验证。网络药理学筛选到蟾蜍灵的药物靶点 285 个, 胃癌相关的疾病靶点 909 个, 蟾蜍灵与胃癌的交集靶点 91 个, 结合 PPI 网络度值排名、胃癌患者中表达水平以及患者生存预后相关性筛选 2 个核心靶点为 HSP90AA1 和 SRC。KEGG 富集分析蟾蜍灵治疗胃癌可能与 PI3K-Akt、FoxO、Ras 和 MAPK 信号通路有关。生存分析结果显示, HSP90AA1 和 SRC mRNA 在胃癌组织中表达显著上调, 且其高表达的患者总生存期显著低于低表达组。分子对接结果显示, 蟾蜍灵与核心靶点具有较好的结合力。细胞实验结果表明, 与对照组相比, 蟾蜍灵处理胃癌细胞 MGC-803 后, 细胞的增殖、迁移能力均下降, 而细胞凋亡数增加。MGC-803 细胞中 HSP90AA1、SRC、Bcl-2、p-AKT 和 FoxO1 蛋白表达水平显著下调, Bax 蛋白的表达显著上调。综上所述, 蟾蜍灵可能通过调控 HSP90AA1 和 SRC 核心蛋白及 Akt/FoxO1 信号通路发挥治疗胃癌的作用。

**关键词:**网络药理学; 蟾蜍灵; 胃癌; 增殖; 迁移; 凋亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)6-1045-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.6.015

## Mechanism of bufalin in the treatment of gastric cancer based on network pharmacology and cellular experiment

LIU Yu-ling<sup>1,2\*</sup>, CHEN Li-rong<sup>1</sup>, HOU Yan-xiang<sup>1</sup>, WANG Yuan-sen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College of Shanxi Medical University;

<sup>2</sup>Department of Oncology, Fenyang Hospital of Shanxi Province, Fenyang 032200, China

**Abstract:** To explore the mechanism of action of bufalin in the treatment of gastric cancer based on network pharmacology, molecular docking and cellular experiments in the study. The PubChem and PharmMapper databases were used to retrieve the drug targets of bufalin, and the related targets of gastric cancer were collected in the GeneCards database, and the PPI network diagram for common targets of drugs and diseases was constructed by Venny software and STRING database, and GO enrichment and KEGG pathway analysis were performed through the DAVID database. Cytoscape3.9.0 software was used to visualize and screen the core targets, and the relationship between the core targets and gastric cancer and bufalin was analyzed by GIEPA database, Kaplan-Meier method, AutoDock and PyMOL software, respectively. Finally, the targets and pathways predicted by network pharmacology were experimentally verified by cellular experiments. The results of network pharmacology showed that 285 drug targets and 909 gastric cancer targets were screened out. The number of common targets between bufalin and gastric cancer were 91, HSP90AA1 and SRC were core targets based on the ranking of PPI network value, the expression level in gastric cancer patients, and the correlation of survival and prognosis. KEGG enrichment analysis showed that bufalin in the treatment of gastric cancer may be related to PI3K-Akt, FoxO, Ras and MAPK signaling pathways. The results of surviv-

al analysis showed that the expression of HSP90AA1 and SRC mRNA in gastric cancer tissues was significantly up-regulated, and the overall survival of patients with high expression was significantly lower than that of the low expression group. The molecular docking results showed that the core targets had relatively strong binding activities with bufalin. The results of cellular experiments showed that compared with the control group, the proliferation and migration of gastric cancer cells MGC-803 were decreased, and the number of apoptosis was increased. The expression levels of HSP90AA1, SRC, Bcl-2, p-AKT and FoxO1 were significantly down-regulated, and the expression of Bax protein was significantly up-regulated. In summary, bufalin may play a role in the treatment of gastric cancer by regulating the core protein of HSP90AA1 and SRC and the Akt/FoxO1 signaling pathway.

**Key words:** network pharmacology; bufalin; gastric cancer; proliferation; migrate; apoptosis

胃癌(gastric cancer)是消化系统中最常见的恶性肿瘤之一。据2020年全球癌症数据统计,胃癌新发病例超过100多万新发病例,约有76.9万人死亡,相当于全球每13例胃癌病例就有1例死亡,其在全球发病率排名第五,死亡率排名第四<sup>[1]</sup>。目前临床上针对胃癌的治疗方法仍然是手术切除和化疗等,但患者的预后仍然不乐观,5年生存率仅为20%左右<sup>[2]</sup>。因此,寻找安全有效的胃癌治疗药物显得尤为关键。中药作为天然的药物,且在癌症治疗过程中具有重要的作用<sup>[3]</sup>。

蟾蜍灵(bufalin)是从中华大蟾蜍皮和耳后腺分泌物中提取的一种强心类固醇,具有地高辛样免疫活性,不仅具有解毒、消肿和镇痛等作用,同时在抗肿瘤中也发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>。研究表明,蟾蜍灵可以杀死多种实体瘤和血液肿瘤,如前列腺癌<sup>[5]</sup>、肝肿瘤<sup>[6]</sup>和白血病<sup>[7]</sup>,其作用机制包括抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、诱导细胞自噬、破坏细胞周期和调节免疫反应等。研究表明蟾蜍灵可以抑制胃癌细胞的增殖和迁移<sup>[8]</sup>,但关于蟾蜍灵治疗胃癌的作用机制仍不明确。

网络药理学是一种基于“药物-靶点-疾病”相互作用的网络,可用于探究药物治疗疾病的分子机制<sup>[9]</sup>。因此,本研究借助于网络药理学和分子对接技术,同时结合体外实验进一步研究蟾蜍灵治疗胃癌的分子机制,为后期蟾蜍灵临床治疗胃癌提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

胃癌 MGC-803 细胞为山西医科大学汾阳学院张笑添老师馈赠,用含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中。

### 1.2 试剂

蟾蜍灵(纯度 $\geq$ 98%,美仑生物,批号:465-21-

4);RPMI 1640 培养基、青-链霉素、0.25% 胰蛋白酶、RIPA 强裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、ECL 超敏化学发光液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(武汉博士德有限公司,批号分别为 PYG0006、PYG0016、PYG0014、AR0102-100、AR0146、AR0138、AR1171、AR1178、AR1183、BA1054);蛋白 Marker(聚合美生物科技有限公司,批号为 S05001165);kFluor488 Click-iT EdU 成像检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号为 K230804);PBS、MTT 试剂、结晶紫、无酶无菌水、细胞培养级 DMSO 试剂(北京索莱宝公司,批号分别为 P1020、M8180、C8470、R1600、D8371);兔抗 HSP90 $\alpha$  单克隆抗体、兔抗 SRC 单克隆抗体、兔抗 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗 Bax 单克隆抗体、兔抗 FoxO1 单克隆抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号分别为 ET1605-57、ET1702-03、ET1702-53、ET1603-34、ET1608-25);兔抗 p-AKT 单克隆抗体(美国 CST 公司,批号为 9271);鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号为 TA-09)。

### 1.3 主要仪器

HF90  $\text{CO}_2$  恒温培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);AlphaClean 1300 超净工作台(力康生物医疗科技控股有限公司);Synergy H4 多功能酶标仪(美国 BIOTEK);ECLIPSE Ti2 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);GelDoc Go 12009077 化学发光凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);BY-R16 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。

### 1.4 网络药理学分析

#### 1.4.1 蟾蜍灵作用靶点和疾病靶点的筛选和收集

在 PubChem 平台库(<https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 PharmMapper 数据库(<https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)中,输入“bu-

falin”关键词。以“gastric cancer”为关键词在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中进行检索,最终获得与胃癌相关的作用靶点,将药物预测的靶点与疾病相关的靶点取交集,通过在线软件绘制韦恩图,即获得了蟾蜍灵和胃癌之间的潜在靶点。

#### 1.4.2 潜在靶点相互作用网络的构建和核心靶点筛选

将药物与疾病相交的靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>),选择物种为“Homo sapiens”,设置 required score 为“highest confidence (0.700)”进行蛋白质相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI) 构建,同时将结果导入 Cytoscape3.9.0 软件 (<https://cytoscape.org/>) 中绘制 PPI 网络图,并使用“Betweenness Centrality”筛选出 TOP3 的基因,然后使用 GIEPA 数据库分析核心基因在胃癌组织和正常胃组织中 mRNA 表达水平 ( $|\log FC| > 1$  和  $P < 0.05$  表示基因有显著差异),Kaplan-Meier 方法分析核心基因与胃癌患者生存预后的关联 ( $P < 0.05$  视为有统计学差异)。

#### 1.4.3 GO 和 KEGG 富集分析

将核心靶蛋白输入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中,Identifier 选择“OFFICIAL-GENE-SYMBOL”,物种选择“Homo sapiens”,通过“Gene List”,进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,根据  $P$  值筛选相关 GO 功能和 KEGG 通路,并通过微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 将所得结果进行可视化处理。

#### 1.4.4 分子对接

首先通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 查出蟾蜍灵的 3D 结构,其次通过 PyMOL 软件去除分子中的配体和水分子,然后将药物分子和核心靶点用 AutoDockTools1.5.6 进行分子对接,最后通过 PyMOL 软件获得可视化的结果。

### 1.5 细胞实验

#### 1.5.1 MTT 法检测蟾蜍灵对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响

将对数期生长的 MGC-803 细胞以  $3 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,待细胞贴壁后,加入不同浓度 (0、25、50、75、100、150 nmol/L) 的蟾蜍灵培养 24、48 和 72 h 后,加入 20  $\mu\text{L}$  5 mg/mL 的 MTT 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$ ,继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  的 DMSO,室温放置使结晶溶液后,用酶标仪检测 490 nm 处每孔的吸光值,每次实验重复 3 次,

计算细胞的存活率:细胞存活率 =  $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

#### 1.5.2 划痕实验检测蟾蜍灵对 MGC-803 细胞迁移能力的影响

将处于对数生长期的 MGC-803 以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,用 200  $\mu\text{L}$  的枪头在孔内划线,用 PBS 将漂浮的细胞轻轻洗涤 3 次,然后将不同浓度 (0、50、75 和 100 nmol/L) 的蟾蜍灵加入对应的孔后,在培养箱中继续培养 48 h 后,经显微镜观察拍照后,用 Image J 软件计算划痕面积。

#### 1.5.3 Edu 实验检测蟾蜍灵对胃癌 MGC-803 细胞增殖能力的影响

将处于对数期生长的 MGC-803 细胞以  $3 \times 10^5$  个/mL 接种于 24 孔板中培养,每孔 500  $\mu\text{L}$ 。待细胞贴壁后,用不同浓度的蟾蜍灵对 MGC-803 细胞进行处理 48 h,弃去上清液,加入含有 10  $\mu\text{mol/L}$  Edu 的培养基,于细胞培养箱中继续孵育 2 h,用含有 3% BSA 的 PBS 洗涤 2 次,使用 4% 中性多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤 2 次,加入含有 0.5% Triton-100 的 PBS 室温孵育 20 min, PBS 清洗 2 次,每孔加入 Click-iT 反应液混合物室温避光孵育 30 min,去除反应液, PBS 洗涤 2 次,加入  $1 \times$  Hoechst 33342 反应液室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,荧光显微镜拍照采集图像。

#### 1.5.4 DAPI 染色检测蟾蜍灵对胃癌 MGC-803 细胞凋亡的影响

将对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,细胞贴壁后,用不同浓度的蟾蜍灵作用于 MGC-803 细胞后,用 4% 多聚甲醛固定细胞, PBS 洗 3 次,加入 DAPI 染色室温孵育 30 min 后,弃去染液, PBS 清洗 3 次后,使用荧光显微镜观察并拍照。

#### 1.5.5 Western blot 检测相关蛋白的表达

收集各组 MGC-803 细胞,用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上提取细胞总蛋白, BCA 法检测细胞蛋白浓度,将等量的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,转至 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜,次日, TBST 室温洗膜 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 1 h 后, TBST 室温洗膜 3 次,每次 10 min。均匀滴加超敏发光液后,经成像仪显影后,用 Image J 软件对结果进行分析。

### 1.5.6 数据统计

采用 GraphPad Primer 5.0 软件对数据进行统计分析,实验数据使用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组数据比较采用  $t$  检验,多组数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学和分子对接验证

#### 2.1.1 获取蟾蜍灵与胃癌的共同靶

通过 PubChem 数据库筛选获得蟾蜍灵作用靶点 285 个;在 GeneCards 数据库中获得胃癌相关靶点 909 个,利用在线软件 Venny2.1 将药物作用靶点与疾病相关靶点进行交集,获得 91 个药物-疾病共同靶点(见图 1)。

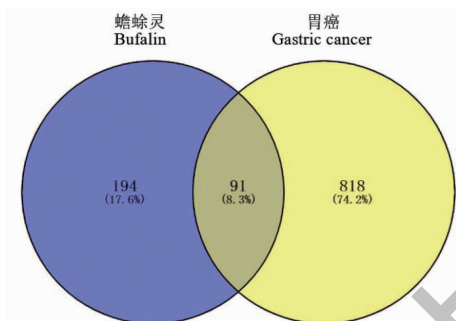


图 1 蟾蜍灵-胃癌共同靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram for the common targets of bufalin-gastric cancer

#### 2.1.2 蟾蜍灵治疗胃癌潜在作用靶点 PPI 网络分析及核心作用靶点筛选

将蟾蜍灵与胃癌的 91 个共同靶点导入 STRING 数据库中进行 PPI 网络分析,分析得出网络共有 91 个节点和 1 187 条边(见图 2)。然后将 PPI 网络图数据导入 Cytoscape 软件中,以度介中心度 (be-

tweenness centrality, BC) 作为核心靶点筛选节点,排名前十的核心靶点,分别为 HSP90AA1、AKT1、SRC、MAPK1、F2、ALB、PIK3R1、CASP3、AR、HRAS(见图 3)。而 HSP90AA1、AKT1 和 SRC 的 BC 值排名前 3。

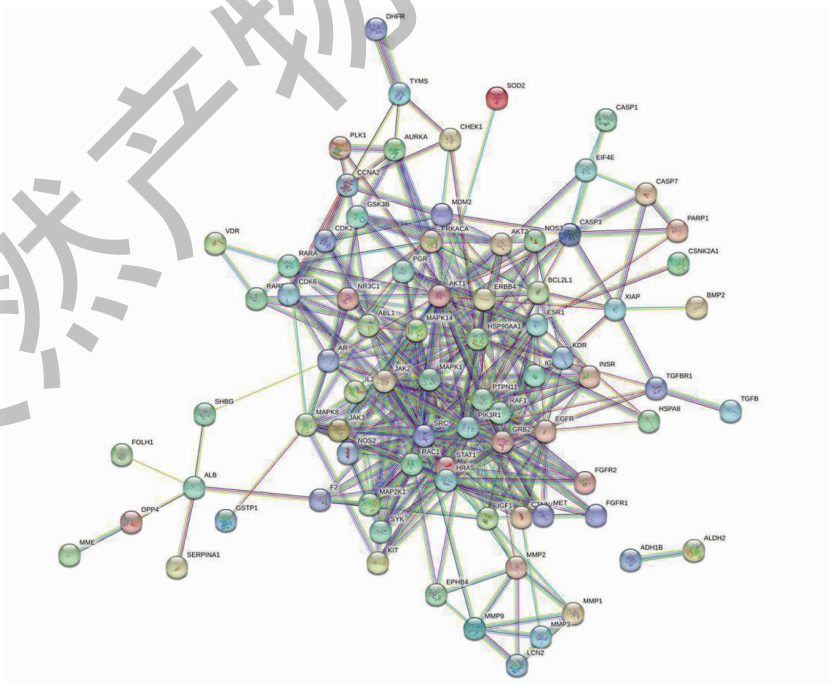


图 2 蟾蜍灵-胃癌的潜在靶点网络

Fig. 2 Network diagram for the potential targets of bufalin-gastric cancer

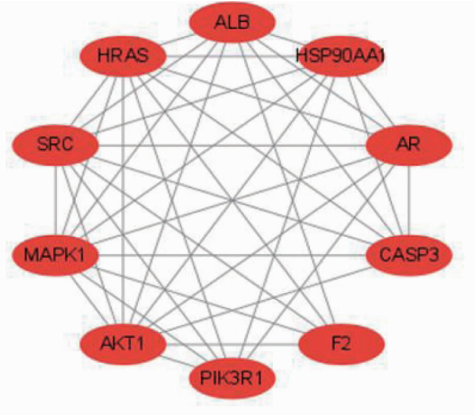


图3 蟾蜍灵-胃癌的关键靶点 PPI 图

Fig. 3 PPI diagram for the key targets of bufalin-gastric cancer

### 2.1.3 核心靶点的表达以及与患者预后的关系

使用 GIEPA 数据库来确定胃癌患者及正常胃组织中 HSP90AA1、AKT1 和 SRC mRNA 表达水平 (见图 4), 结果显示, 与正常胃组织相比, 胃癌组织中 HSP90AA1 和 SRC mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 AKT1 mRNA 表达没有显著差异。使用

Kaplan-Meier 方法评价不同表达的 HSP90AA1、AKT1 和 SRC 对胃癌患者预后的影响, 结果所示: HSP90AA1 和 SRC 在胃癌患者中高表达与其不良预后显著相关 ( $P < 0.01$ ), 而 AKT1 与胃癌患者不良预后相关性不显著 ( $P > 0.05$ ) (见图 5)。

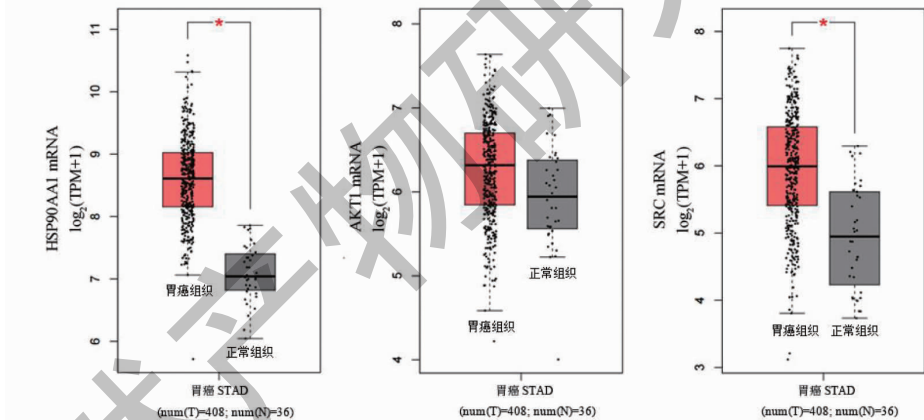


图4 核心靶点 mRNA 在胃癌组织和正常胃组织中的表达

Fig. 4 The mRNA expression levels of core targets in gastric cancer tissue and normal gastric tissue

注: \*  $P < 0.05$ 。

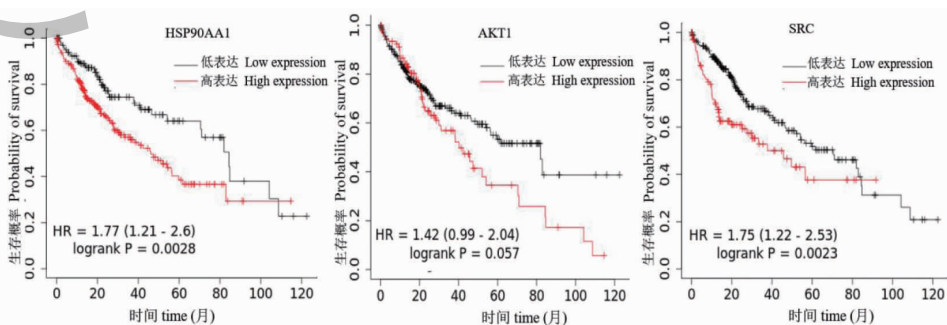


图5 核心靶点对胃癌患者生存的影响

Fig. 5 The impact of core targets on the survival of gastric cancer patients

### 2.1.4 蟾蜍灵抗胃癌的基因 GO 和 KEGG 富集分析

通过 DAVID 数据库对蟾蜍灵与胃癌的 91 个共同靶点基因进行 GO 分析,根据  $P$  值从小到大进行排序,选取前 10 条 GO 条目进分析(见图 6)。结果表明蟾蜍灵主要通过细胞凋亡过程的负调节和蛋白磷酸化等多种生物过程,影响胞浆、细胞质和受体复

合物等细胞组分,参与跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性和蛋白激酶活性等分子功能。KEGG 分析共有 148 条通路,根据  $P$  值选取前 15 条绘制气泡图(见图 7)。通过分析发现 KEGG 通路主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、FoxO 信号通路、Ras 信号通路和 MAPK 信号通路等。

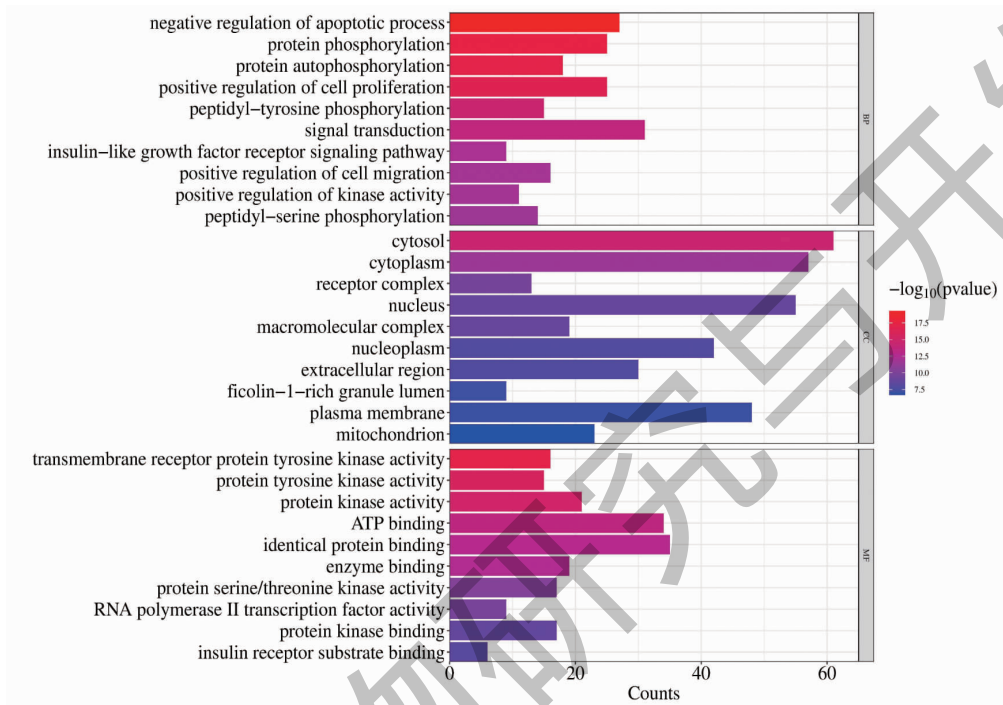


图 6 蟾蜍灵治疗胃癌潜在靶点的 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis of potential targets of bufalin in the treatment of gastric cancer

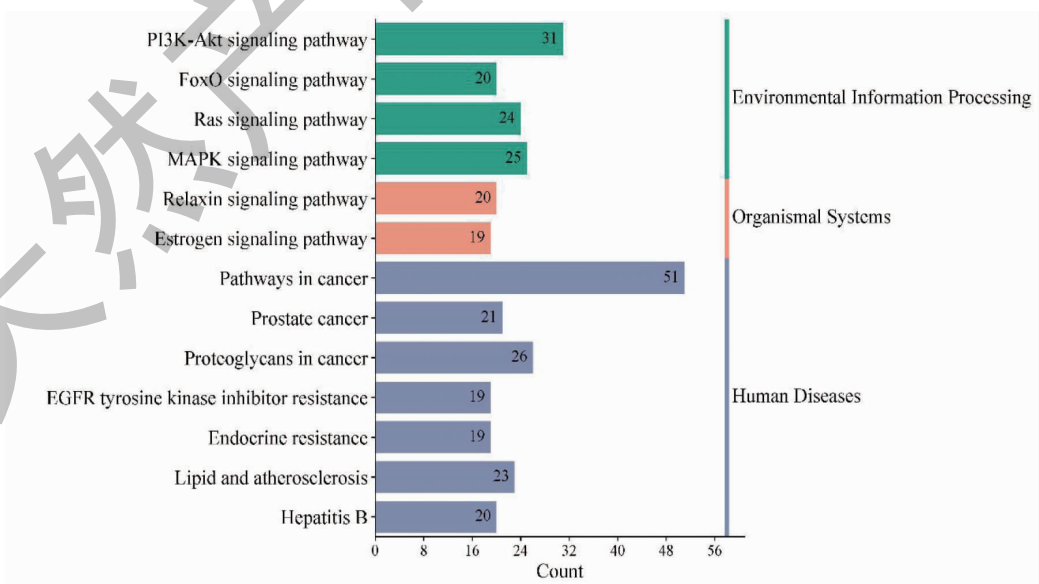


图 7 蟾蜍灵治疗胃癌潜在靶点的 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis of potential targets of bufalin in the treatment of gastric cancer



### 2.1.5 分子对接

采用分子对接预测蟾蜍灵与 HSP90AA1 和 SRC 蛋白的结合位点,结合能  $< -5$  kcal/mol 表示小分子和受体蛋白直接的结合能力较好;结合能  $< -7$  kcal/mol 表示小分子与受体蛋白之间的结合能力具有很

强的结合能力。由分子对接结果显示,蟾蜍灵与关键靶点 HSP90AA1 和 SRC 蛋白结合能力很强,其结合能分别为:  $-8.72$  kcal/mol 和  $-8.26$  kcal/mol (见图 8),由此表明蟾蜍灵可能通过核心靶点 HSP90AA1 和 SRC 蛋白发挥治疗胃癌的作用。

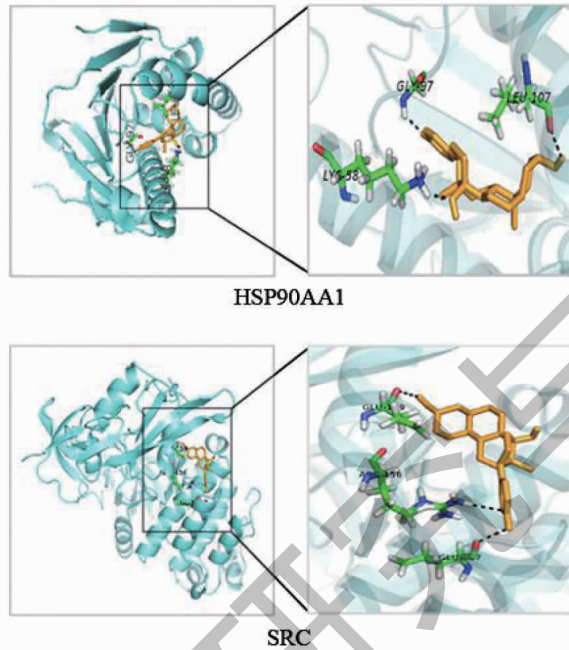


图 8 蟾蜍灵分子与关键靶点蛋白对接模式图

Fig. 8 Docking mode between bufalin molecules and key target proteins

## 2.2 体外细胞实验

### 2.2.1 蟾蜍灵对 MGC-803 细胞增殖的影响

采用 MTT 实验检测蟾蜍灵对 MGC-803 细胞增殖的影响,结果所示,与对照组(0 nmol/L)相比,不浓度(25、50、75、100、150 nmol/L)的蟾蜍灵对 MGC-803 细胞均有一定的抑制作用,且呈剂量相关性和时间相关性(见图 9)。后期选择 50、75 和 100 nmol/L 的蟾蜍灵进行后续实验。进一步 Edu 增殖实验结果表明,与对照组(0 nmol/L)相比,随着蟾蜍灵作用于胃癌细胞的浓度升高后,绿色荧光减少,说明胃癌细胞 MGC-803 的增殖能力显著降低( $P < 0.05$ )(见图 10)。

### 2.2.2 蟾蜍灵对 MGC-803 细胞迁移的影响

划痕实验结果所示,与对照组(0 nmol/L)相比,50、75 和 100 nmol/L 浓度的蟾蜍灵处理 MGC-803 细胞后,迁移率均减小,且与 0 h 相比,蟾蜍灵处理 MGC-803 细胞 24 h 和 48 h 的迁移率均减少,说明蟾蜍灵能够有效抑制 MGC-803 细胞的迁移能力(见图 11)。

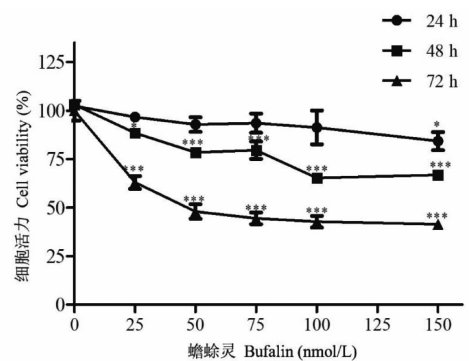


图 9 蟾蜍灵对 MGC-803 细胞增殖的影响

Fig. 9 Effect of bufalin on the proliferation of MGC-803 cells

注:与对照组(0 nmol/L)相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,下同。Note: Compared with control group(0 nmol/L), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , the same below.

### 2.2.3 蟾蜍灵对胃癌 MGC-803 细胞凋亡的影响

不同浓度(0、50、75、100 nmol/L)蟾蜍灵处理胃癌 MGC-803 细胞,经 DAPI 染色,并采用荧光显微镜观察细胞形态,如图所示,对照组(0 nmol/L)细胞核被 DAPI 均匀染成蓝色,细胞核呈圆形和椭圆形;蟾

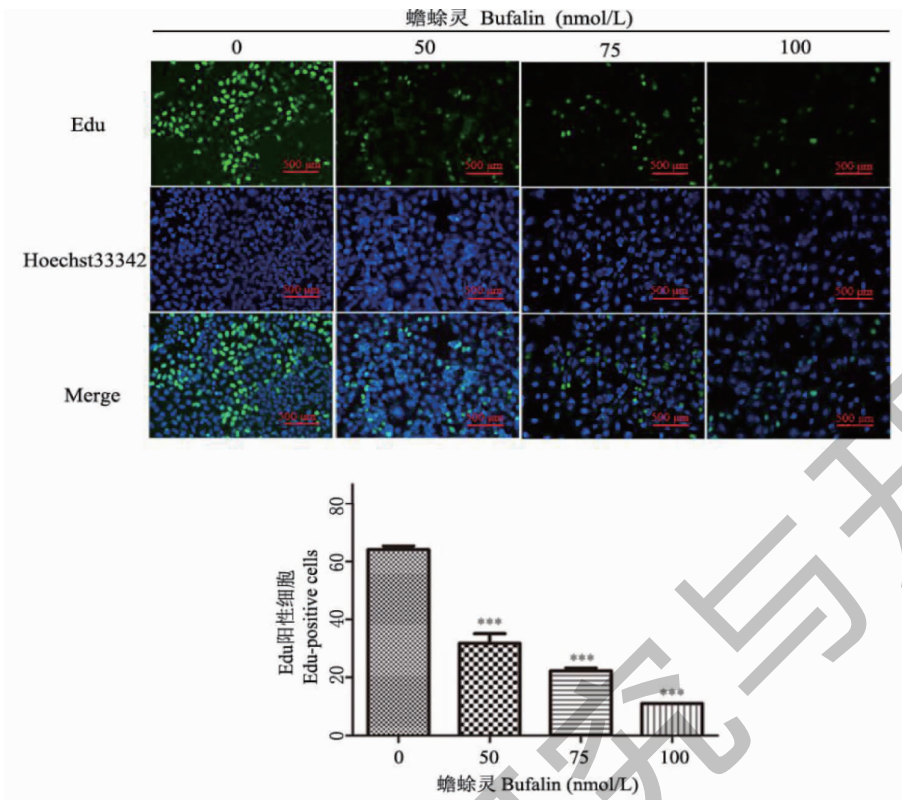


图 10 Edu 实验检测蟾蜍灵对 MGC-803 细胞增殖的影响

Fig. 10 Effect of bufalin on the proliferation of MGC-803 cells by Edu assay

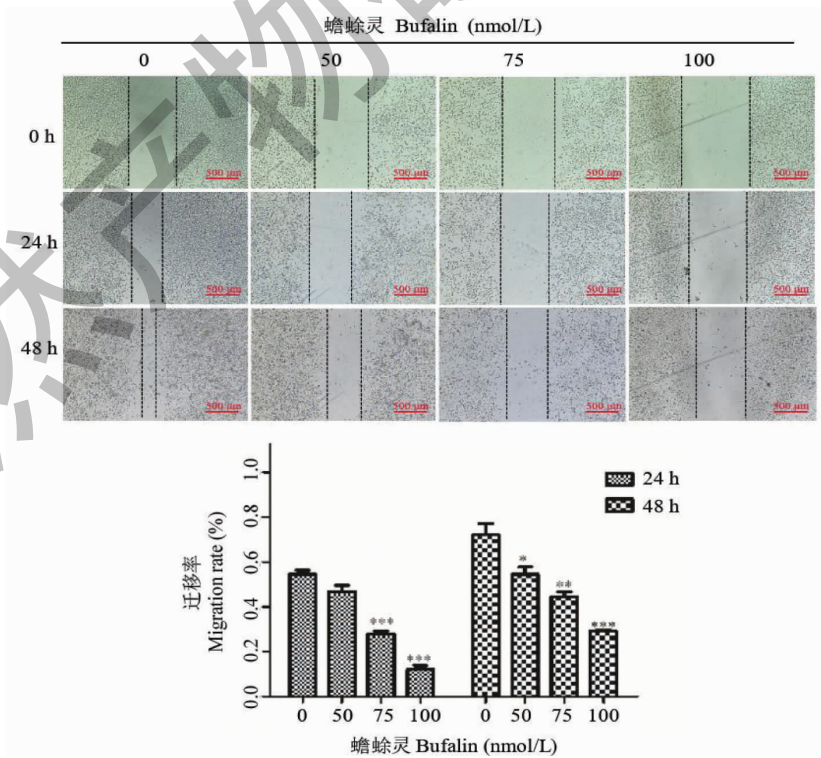


图 11 蟾蜍灵对 MGC-803 细胞迁移能力的影响

Fig. 11 Effect of bufalin on the migration ability of MGC-803 cells



蜍灵 (50、75、100 nmol/L) 处理 MGC-803 细胞后, 细胞核染色不均一, 且细胞核内有染色质凝集, 同时细

胞的密度显著降低 (见图 12)。说明蟾蜍灵诱导胃癌细胞 MGC-803 的凋亡。

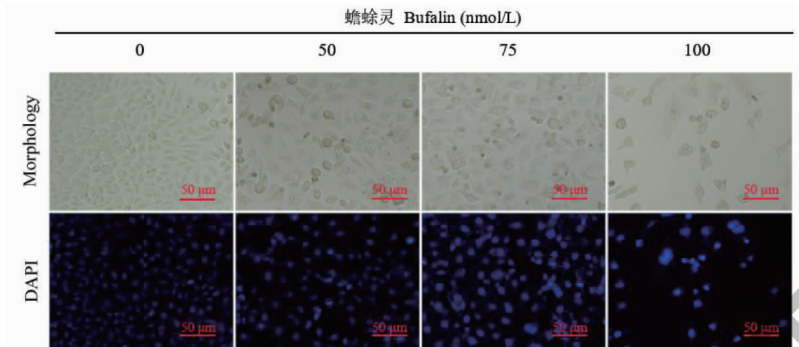


图 12 蟾蜍灵对 MGC-803 细胞凋亡的影响

Fig. 12 Effect of bufalin on apoptosis of MGC-803 cells

注: 白色箭头标记凋亡细胞。Note: Apoptotic cells are marked by white arrows.

### 2.2.4 蟾蜍灵对胃癌 MGC-803 细胞中 HSP90A1、SRC、Bax、Bcl-2、p-AKT 和 FoxO1 蛋白表达的影响

Western blot 检测蟾蜍灵处理胃癌细胞 MGC-803 细胞中 HSP90AA1、SRC、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 实验结果显示, 与对照组 (0 nmol/L) 相比, 蟾蜍灵下调 MGC-803 细胞中 HSP90AA1、SRC 和 Bcl-2 蛋白的表达, 同时上调 Bax

蛋白的表达 (见图 13A)。为了进一步验证蟾蜍灵抑制胃癌细胞 MGC-803 增殖, 诱导细胞凋亡的作用机制, Western blot 进一步检测 AKT1/FoxO1 信号通路关键蛋白的表达情况。结果显示, 和对照组 (0 nmol/L) 相比, 各个组细胞中 p-AKT1 和 FoxO1 蛋白的表达量随着蟾蜍灵浓度的增加而降低 (见图 13B)。

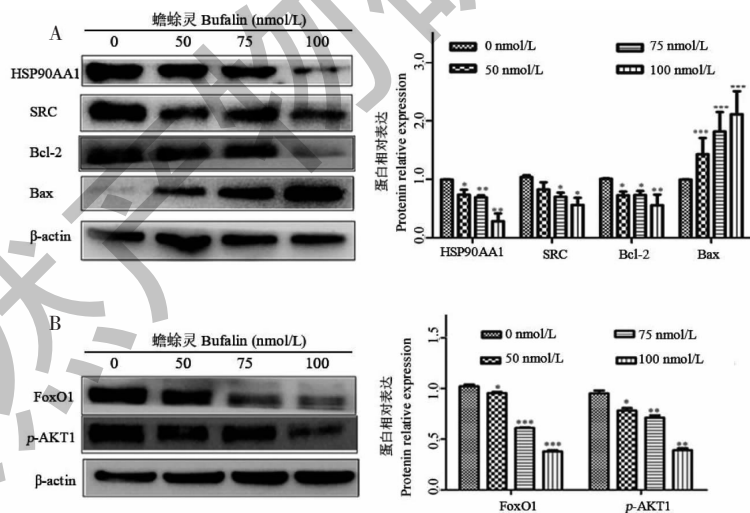


图 13 不同浓度蟾蜍灵对 MGC-803 细胞相关蛋白表达的影响

Fig. 13 Effect of different concentrations of bufalin on the expression of cell-related protein in MGC-803 cells

### 3 讨论与结论

胃癌是一种复杂的疾病, 多靶点药物研究对治疗胃癌具有重要意义。而网络药理学是一种研究药物多靶点的新模式, 且已广泛应用于许多预测分析研究中<sup>[9]</sup>。本研究基于网络药理学方法对蟾蜍灵

治疗胃癌的潜在作用靶点和信号通路进行预测。研究通过药物-靶点-疾病网络图获得 91 个潜在的作用靶点。根据 PPI 网络图分析显示: HSP90AA1、AKT1、SRC、MAPK1、F2、ALB、PIK3R1、CASP3、AR、HRAS 等可能是蟾蜍灵治疗胃癌的核心靶点, 其中

HSP90AA1、AKT1 和 SRC 为相互作用排名前三的靶点。研究中通过 GIEPA 数据库分析发现 HSP90AA1 和 SRC mRNA 在胃癌组织中表达显著高于正常胃组织 ( $P < 0.05$ ), 且 Kaplan-Meier 生存分析显示 HSP90AA1 和 SRC 在胃癌中的高表达与其不良预后显著相关 ( $P < 0.05$ )。因此, 提示 HSP90AA1 和 SRC 可能是蟾蜍灵治疗胃癌的重要核心作用靶点。进一步通过分子对接结果显示, 蟾蜍灵与核心靶点 HSP90AA1 和 SRC 均具有较好的结合能力。

HSP90AA1 基因编码热休克蛋白  $\alpha$  (HSP90 $\alpha$ ), 属于 HSP90 家族, 是细胞内含量丰富的一种分子伴侣, 通过帮助蛋白质折叠, 调节细胞增殖、细胞凋亡和迁移等多种生物学过程<sup>[10]</sup>。研究表明, HSP90AA1 在胃癌中高表达, 且与患者的生存期密切相关<sup>[11]</sup>。而在胃癌细胞中抑制 HSP90AA1 表达可以下调下游蛋白, 促进肿瘤细胞凋亡和延缓肿瘤进展<sup>[12]</sup>。有研究报道, HSP90 通过与 Akt 激酶结合保护 Akt 蛋白的稳定性, 进而激活 Akt 相关信号通路, 调节肿瘤细胞的增殖、凋亡和迁移<sup>[13]</sup>。因此, HSP90AA1 可能是治疗癌症的潜在分子靶点。SRC 是一种非受体酪氨酸激酶, 是首个被发现的致癌性基因, 其通过参与多种信号通路进而影响细胞外信号调控细胞增殖、迁移和凋亡等一系列细胞反应<sup>[14]</sup>。研究发现, SRC 蛋白在胃癌组织中高表达, 抑制 SRC 蛋白的表达可以抑制胃癌细胞增殖和促进细胞凋亡<sup>[15]</sup>。有研究证明, PI3K 为 SRC 蛋白的下游信号分子, 活化的 SRC 可以激活下游的 PI3K 蛋白, 进而触发 AKT 的活性, 从而调节肿瘤细胞的增殖、迁移和凋亡<sup>[16]</sup>。AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 研究表明 AKT1 经常在胃癌中高表达<sup>[17]</sup>。在胃癌中, AKT1 通过增强或抑制靶蛋白的活性参与细胞增殖、迁移、侵袭和转移等多种生物过程<sup>[18]</sup>。提示 AKT 信号通路在胃癌发生发展中可能具有重要的作用。FoxO1 是 AKT 信号通路下游的一个重要的转录调控因子, 不仅对胃癌细胞的增殖、迁移和凋亡具有重要作用, 还对胃癌细胞的新陈代谢具有一定的抑作用<sup>[19]</sup>。研究发现鱼藤素能够通过 AKT/FoxO1 信号通路调节凋亡因子的释放从而诱导胃癌细胞的凋亡<sup>[20]</sup>。KEGG 通路富集分析发现, 潜在作用靶点主要涉及细胞凋亡、PI3K/AKT、FoxO、RAS 和 MAPK 等多条信号通路。因此, 以上提示 AKT/FoxO1 信号通路可能在蟾蜍灵抑制胃癌细胞增殖和促进细胞凋亡过程中发挥着重要的作

用。

本研究通过 MTT 实验、Edu 实验和细胞划痕实验发现不同浓度蟾蜍灵可抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖、迁移, 并促进细胞凋亡。并通过 Western blot 检测不同浓度蟾蜍灵除作用于胃癌细胞后, 核心靶点 HSP90AA1、SRC 和凋亡相关蛋白的表达, 结果显示, 随着蟾蜍灵作用浓度的增加, MGC-803 细胞中 HSP90AA1、Src 和 Bcl-2 蛋白的表达下调, 同时 Bax 蛋白的表达上调。为了研究蟾蜍灵是如何通过抑制细胞增殖来促进细胞凋亡的, 本研究通过 Western blot 进一步检测 p-AKT 和 FoxO1 蛋白表达水平, 结果显示, 随着蟾蜍灵浓度的增加, p-AKT 和 FoxO1 蛋白表达水平降低, 因此, 推测蟾蜍灵可能以 HSP90AA1 和 SRC 为主要靶点, 影响下游 AKT/FoxO1 信号通路, 发挥治疗胃癌的作用。

综上所述, 本研究以胃癌 MGC-803 细胞为研究对象, 探究蟾蜍灵对胃癌 MGC-803 细胞增殖、凋亡和迁移的影响和分子机制。实验结果表明蟾蜍灵可能通过下调核心靶点 HSP90AA1 和 SRC 表达, 进而调控 AKT/FoxO1 信号通路抑制胃癌细胞 MGC-803 的增殖、迁移, 促进其凋亡。为蟾蜍灵治疗胃癌的新药和新方法提供了思路和理论依据。而本研究不足之处是仅探讨了蟾蜍灵在体外对 MGC-803 细胞的影响, 下一步将进行体内实验, 进一步深入研究蟾蜍灵治疗胃癌的作用机理。

#### 参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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, 71:209-249.
- 2 Zeng Y, Jin RU. Molecular pathogenesis, targeted therapies, and future perspectives for gastric cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86:566-582.
- 3 Ji KY, Li GL, Wu SH, et al. Research progress of traditional Chinese medicine intervention in cancer immune escape[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2024, 36:167-174.
- 4 Soumoy L, Ghanem GE, Saussez S, et al. Bufalin for an innovative therapeutic approach against cancer[J]. Pharmacol Res, 2022, 184:106442.
- 5 Zhang JJ, Zhou XH, Zhou Y, et al. Bufalin suppresses the migration and invasion of prostate cancer cells through HO-TAIR, the sponge of miR-520b[J]. Acta Pharmacol Sin,

- 2019,40:1228-1236.
- 6 Yu Z, Li Y, Li Y, et al. Bufalin stimulates antitumor immune response by driving tumor-infiltrating macrophage toward M1 phenotype in hepatocellular carcinoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10: e004297.
  - 7 Shih YL, Chou JS, Chen YL, et al. Bufalin Enhances immune responses in leukemic mice through enhancing phagocytosis of macrophage *in vivo* [J]. *In Vivo*, 2018, 32: 1129-1136.
  - 8 Chen G, Zhang H, Sun H, et al. Bufalin targeting BFAR inhibits the occurrence and metastasis of gastric cancer through PI3K/AKT/mTOR signal pathway [J]. *Apoptosis*, 2023, 28: 1390-1405.
  - 9 Liu XL, Zhu PY, Ma JR, et al. Antioxidant activity and mechanism of *Centranthera grandiflora* Benth roots based on network pharmacology and *in vitro* experiments [J]. *Nat Prod Res AND Dev (天然产物研究与开发)*, 2024, 36(1): 155-166.
  - 10 Birbo B, Madu EE, Madu CO, et al. Role of HSP90 in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 10317.
  - 11 Hui Y, Yuan WG, Wei S, et al. circSLC4A7 accelerates stemness and progression of gastric cancer by interacting with HSP90 to activate NOTCH1 signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14: 452.
  - 12 Pahwa R, Dubhashi J, Singh A, et al. Inhibition of HSP 90 is associated with potent anti-tumor activity in papillary renal cell carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41: 208.
  - 13 Tang F, Li Y, Pan M, et al. HSP90AA1 promotes lymphatic metastasis of hypopharyngeal squamous cell carcinoma by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncol Res*, 2023, 31: 787-803.
  - 14 He L, Feng A, Guo H, et al. LRG1 mediated by ATF3 promotes growth and angiogenesis of gastric cancer by regulating the SRC/STAT3/VEGFA pathway [J]. *Gastric Cancer*, 2022, 25: 527-541.
  - 15 Gao P, Seebacher NA, Hornicek F, et al. Advances in sarcoma gene mutations and therapeutic targets [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62: 98-109.
  - 16 Liu W, Guo TF, Jing ZT, et al. Hepatitis B virus core protein promotes hepatocarcinogenesis by enhancing Src expression and activating the Src/PI3K/Akt pathway [J]. *FASEB J*, 2018, 32: 3033-3046.
  - 17 Verma K, Jaiswal R, Paliwal S, et al. An insight into PI3k/Akt pathway and associated protein-protein interactions in metabolic syndrome: a recent update [J]. *J Cell Biochem*, 2023, 124: 923-942.
  - 18 Li L, Wang K, Liu Z, et al. Compound Kushen injection inhibits EMT of gastric cancer cells via the PI3K/AKT pathway [J]. *World J Surg Oncol*, 2022, 20: 161.
  - 19 Lloreta J, Font-Tello A, Juanpere N, et al. FOXO1 down-regulation is associated with worse outcome in bladder cancer and adds significant prognostic information to p53 overexpression [J]. *Hum Pathol*, 2017, 62: 222-231.
  - 20 Li L, Sun C, Liu L, et al. Mechanism of deguelin in inducing gastric cancer cell apoptosis by AKT/FoxO1 signaling pathway [J]. *World Chin Med*, 2022, 17: 2575-2579.
- 
- (上接第 1063 页)
- 15 He B, Zeng J, Liu W, et al. Effect of hirudin on pulmonary fibrosis by regulating p38MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2022, 38: 1334-1340.
  - 16 Lyu JM, Tang YH, He CH, et al. Effects of the combination of cycloheximide and total flavonoid from *Dracocephalum moldavica* L. on mice with pulmonary fibrosis [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2024, 36: 109-116.
  - 17 Xiong Y, Cui X, Zhou Y, et al. Dehydrocostus lactone inhibits BLM-induced pulmonary fibrosis and inflammation in mice via the JNK and p38 MAPK-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107780.
  - 18 Wei P, Xie Y, Abel PW, et al. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-induced miR-133a inhibits myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 670.
  - 19 Wang Y, Zhang S, Li F, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: D1031-D1041.
  - 20 Hossain FMA, Choi JY, Uyangaa E, et al. The interplay between host immunity and respiratory viral infection in asthma exacerbation [J]. *Immune Netw*, 2019, 19: e31.