

基于系统网络药理学分析水飞蓟宾治疗胃癌的作用机制



米佳丽¹, 石磊², 王丽娜², 吴超才²

1. 庆阳市人民医院消化内科 (甘肃庆阳 745000)

2. 庆阳市人民医院急诊科 (甘肃庆阳 745000)

【摘要】目的 基于网络药理学和实验验证探讨水飞蓟宾抗胃癌作用及其分子机制。方法 借助PubChem、SuperPRED及SwissTargetPrediction数据库获取水飞蓟宾作用靶点,通过GeneCards、OMIM及DrugBank数据库筛选胃癌相关靶点。将水飞蓟宾与胃癌交集靶点导入STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络,进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。采用CCK-8法检测水飞蓟宾对AGS和HGC27细胞活力的影响,运用平板克隆形成实验、细胞划痕及迁移实验分别评估水飞蓟宾对AGS细胞增殖和迁移能力的影响,通过蛋白质印迹法分析磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B (PI3K/AKT) 通路相关蛋白表达。**结果** 网络药理学分析获得水飞蓟宾与胃癌交集靶点92个,KEGG富集结果表明PI3K/AKT信号通路显著富集。实验结果表明,水飞蓟宾作用于AGS和HGC27细胞的IC₅₀值分别为87.33 μmol/L和87.49 μmol/L。进一步研究发现,水飞蓟宾剂量依赖性抑制AGS细胞增殖、克隆形成及迁移能力 ($P < 0.05$)。蛋白质印迹法检测结果显示,水飞蓟宾呈剂量依赖性降低磷酸化PI3K、磷酸化AKT、基质金属蛋白酶9蛋白表达水平,上调肿瘤蛋白P53 ($P < 0.05$);而胰岛素样生长因子-1可部分逆转水飞蓟宾的上述作用 ($P < 0.05$)。**结论** 水飞蓟宾可通过抑制PI3K/AKT信号通路磷酸化激活,下调MMP9表达、上调TP53表达,进而抑制胃癌细胞增殖和迁移。

【关键词】 水飞蓟宾; 胃癌; 网络药理学; PI3K/AKT信号通路; 细胞增殖; 细胞迁移; 作用机制

【中图分类号】 R 735.2 **【文献标识码】** A

The mechanism of silybin in treating against gastric cancer based on systematic network pharmacology analysis

MI Jiali¹, SHI Lei², WANG Lina², WU Chaocai²

1. Department of Gastroenterology, Qingyang Municipal People's Hospital, Qingyang 745000, Gansu Province, China

2. Department of Emergency, Qingyang Municipal People's Hospital, Qingyang 745000, Gansu Province, China

Corresponding author: SHI Lei, Email: 18194194444@163.com

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202603065

通信作者: 石磊, Email: 18194194444@163.com

<https://slyyx.whuzhmedj.com/>

【Abstract】 Objective To investigate the anti-gastric cancer effects of silybin and its underlying molecular mechanisms based on network pharmacology and experimental validation. **Methods** Potential targets of silybin were retrieved from the PubChem, SuperPRED, and SwissTargetPrediction databases, while gastric cancer-related targets were screened from the GeneCards, OMIM, and DrugBank databases. The intersecting targets of silybin and gastric cancer were imported into the STRING database to construct the protein-protein interaction (PPI) network, followed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses. The CCK-8 assay was used to evaluate the effects of silybin on the viability of AGS and HGC27 cells. Colony formation, wound healing, and transwell migration assays were performed to assess the effects of silybin on the proliferation and migration of AGS cells, respectively. Western blotting was employed to analyze the expression of proteins associated with the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway. **Results** Network pharmacology analysis identified 92 intersecting targets between silybin and gastric cancer. KEGG enrichment analysis revealed significant enrichment of the PI3K/AKT signaling pathway. Experimental validation showed that the IC₅₀ values of silybin in AGS and HGC27 cells were 87.33 $\mu\text{mol/L}$ and 87.49 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Furthermore, silybin dose-dependently inhibited the proliferation, colony formation, and migration of AGS cells ($P < 0.05$). Western blotting results demonstrated that silybin dose-dependently decreased the protein expression levels of phosphorylated PI3K (p-PI3K), phosphorylated AKT (p-AKT), and matrix metalloproteinase 9 (MMP9), while upregulating tumor protein P53 (TP53) ($P < 0.05$). Notably, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) partially reversed these effects of silybin ($P < 0.05$). **Conclusion** Silybin suppresses gastric cancer cell proliferation and migration by suppressing the phosphorylation activation of the PI3K/AKT signaling pathway, downregulating MMP9 expression, and upregulating TP53 expression.

【Keywords】 Silybin; Gastric cancer; Network pharmacology; PI3K/AKT signaling pathway; Cell proliferation; Cell migration; Mechanism

胃癌作为全球范围内的常见癌症，是一种起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤。我国胃癌的发病率和死亡率分别占全球的44%和48.6%，是全球胃癌疾病负担最重的国家之一^[1]。由于胃癌早期症状隐匿且缺乏典型临床表现，主要以上腹部不适、食欲下降、消化不良为主要症状，因此多数患者确诊时已错失最佳手术治疗时间^[2]。针对进展期及晚期胃癌，治疗手段包括围手术期化疗（如5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、多西他赛等方案联合免疫治疗）、免疫检查点抑制剂及靶向治疗等^[3]。上述治疗方案疗效有限且存在诸多局限性，包括药物毒副作用较大、患者耐受性差、治疗费用高昂等^[4]。因此，需要新的治疗策略，以延长患者寿命并改善胃癌患者的生活质量。

水飞蓟是菊科水飞蓟属一年或二年生草本植物，作为传统药用植物已有2 000多年的应用历史^[5]。水飞蓟素是从其干燥成熟果实中提取的黄酮木脂素类混合物，其中水飞蓟宾为主要活

性成分，占比约50%~70%，且生物活性最强，具有保肝抗纤维化、抗炎、抗氧化、免疫调节及降血脂等多种药理作用^[6-7]。近年来，水飞蓟宾的抗肿瘤作用逐渐受到广泛关注。水飞蓟宾可通过抑制Yes相关蛋白信号通路诱导乳腺癌细胞G2/M期阻滞^[8]，通过下调细胞外信号调节激酶1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, Erk1/2)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) 及信号转导与转录激活因子3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等信号通路抑制头颈部鳞状细胞癌生长^[9]。上述研究提示，水飞蓟宾可通过调控肿瘤细胞增殖与存活相关的关键信号通路发挥抗肿瘤作用。已有研究系统评估了水飞蓟宾对幽门螺杆菌感染及胃癌细胞的抑制作用^[10]。然而，目前关于水飞蓟宾在胃癌中的作用及其潜在作用机制尚未明确。

网络药理学作为一种基于系统生物学和计算机技术的研究方法，通过整合药代动力学参数筛选、靶点预测及信号通路富集分析，可从

“成分-靶点-通路”多维度系统阐释药物的潜在作用机制^[11]。水飞蓟宾具有多靶点、多通路的药理学特性，本研究运用网络药理学方法，预测水飞蓟宾抗胃癌的潜在作用靶点及相关信号通路，并通过体外细胞实验进行验证，以期水飞蓟的临床应用和抗胃癌药物的研发提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

人胃腺癌细胞系 AGS (human gastric adenocarcinoma cell line AGS)、人低分化胃腺癌细胞系 HGC27 (human gastric carcinoma cell line HGC27) 均购自北京协和医学院基础学院细胞资源中心。水飞蓟宾 (质量分数 98)、二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO)、结晶紫染色液购自 Solarbio 公司。RPMI 1640 细胞培养基和胎牛血清购自美国 Life Sciences 公司。DMEM 培养基购自上海泰坦公司。CCK-8 试剂盒购自武汉赛维尔公司；肿瘤蛋白 P53 (tumor protein 53, TP53)、PI3K、Akt 激酶抗体、磷酸化 Akt (p-Akt) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein 9, MMP9) 抗体、GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 水飞蓟宾治疗胃癌的潜在靶点获取

以“silybin”为检索词，在 PubChem 数据库中检索并获取水飞蓟宾的 SMILES 号；以该 SMILES 号为关键词，将物种限定为“Homo sapiens”，分别于 Super-PRED 数据库 (https://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.php) 及 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 中进行水飞蓟宾靶点检索，筛选置信度 > 0.7 的靶点。通过 DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.ca/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 及 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 检索胃癌相关靶点，GeneCards 筛选评分 > 5 的靶点，三库结果合并去重。采用韦恩在线工具 (<https://bioinfo.cnbcscic.es/tools/venny/>) 绘制水飞蓟宾作用靶点与胃癌相关靶点的韦恩图，以获得水飞蓟宾治疗胃癌的潜在作用靶点。

1.2.2 成分-疾病靶点相互作用网络图构建

将水飞蓟宾和胃癌交集靶点基因导入 STRING 库，物种设置为“Homo Sapiens”，置信度得分 > 0.7，剔除离散节点，绘制蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。利用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化。

1.2.3 通路富集分析

将交集靶点基因导入 DAVID 数据库，以 $P < 0.05$ 、 $FDR < 0.01$ 为筛选阈值，筛选显著富集条目，分析基因本体论 (GO, Gene Ontology) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 富集情况。通过微生信在线工具可视化处理富集结果，然后绘制信号通路富集图。

1.2.4 细胞培养

将 AGS 细胞和 HGC27 细胞置于 RPMI 1640 培养基 (10% 胎牛血清) 和 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清)，然后置于培养箱培养 (培养条件: 37 °C、5% CO₂)。

1.2.5 水飞蓟宾对细胞增殖抑制检测

取生长旺盛的 AGS 与 HGC27 细胞，按每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板，根据要求常规培养 24 h。分别向各孔加入终浓度为 5、10、20、50、80、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$ 的水飞蓟宾溶液，继续孵育 48 h。实验同时设立对照组 (加入等体积完全培养基) 与空白组 (仅含完全培养基，未接种细胞)。结束后每孔加入 CCK-8 检测试剂，避光孵育 2 h。然后测定 450 nm 波长处的 OD 值，根据所得结果确定出细胞增殖抑制率。细胞抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.2.6 水飞蓟宾对 AGS 细胞增殖能力的影响

取对数生长期的 AGS 细胞，按每孔 8×10^3 个细胞接种于 96 孔板。待细胞贴壁后，将培养基更换为含 43.67、87.33、174.66 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾的培养液，对照组加入等量 RPMI 1640 培养基。培养 24 h 后经胰蛋白酶消化并计数，重新接种至 6 孔板中培养 14 天。固定 15 min，结晶紫染色 20 min 后拍照记录。通过 ImageJ 软件测量各组细胞占据的孔板面积，计算克隆形成率。

1.2.7 Transwell 检测水飞蓟宾对 AGS 细胞迁移能力的影响

取对数生长期的 AGS 细胞，以含 43.67、87.33、174.66 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾的无血清培养基预处理 24 h。

经胰酶消化收集细胞后,用无血清RPMI 1640培养基重悬,取0.2 mL悬液接种于迁移小室上室。下室加0.6 mL含10%FBS的RPMI 1640完全培养基,然后在标准培养箱环境下孵育24 h。完毕后擦拭去除上室未迁移细胞。固定下室膜背面的迁移细胞15 min, PBS漂洗后用0.1%结晶紫染色20 min,再次漂洗、晾干。镜下观察并拍照,运用ImageJ软件分析照片,计算各组细胞的平均迁移数。

1.2.8 划痕实验测定水飞蓟宾对AGS细胞迁移的作用

取生长旺盛的AGS细胞,接种于6孔板中培养。观察细胞处于单层状态后,使用200 μ L无菌移液枪头在孔板底部垂直划出直线痕迹,以PBS缓冲液轻柔漂洗2至3次,去除因划痕而脱落的细胞碎片。分别向各孔加入含43.67、87.33、174.66 μ mol/L水飞蓟宾的无血清培养基,置于培养箱中继续培养。于划痕处理后0 h及24 h,在镜下对同一划痕位置拍照。通过ImageJ软件测量各时间点划痕区域的面积,并据此计算细胞迁移率:迁移率=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h划痕面积 \times 100%。

1.2.9 蛋白质印迹法分析PI3K/AKT通路相关蛋白表达

取对数生长期的AGS细胞接种于60 mm培养皿中,分别加入含43.67、87.33、174.66 μ mol/L水飞蓟宾的培养基处理,对照组加入不含药物的等体积培养基。处理结束后,加入裂解液于冰上裂解15 min,于13 800 r/min离心后收集上清液。运用BCA蛋白定量试剂盒测定样本蛋白质质量浓度。取等量蛋白样品行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,产物转移至PVDF膜。室温封闭2 h后,分别加入PI3K (1:1 000)、磷酸化PI3K (p-PI3K) (1:1 000)、AKT (1:1 000)、p-AKT (1:1 000)、MMP9 (1:1 000)、TP53 (1:1 000)及内参GAPDH (1:5 000)一抗,于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。经TBST洗膜,加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:5 000)室温孵育。采用ECL显色,利用ImageJ软件分析条带灰度值,以GAPDH为内参确定出相对表达水平。

1.2.10 胰岛素样生长因子-1与水飞蓟宾共处理对AGS细胞蛋白表达的影响

将AGS细胞接种于60 mm培养皿中,待细胞融合度达70%~80%时进行分组处理。空白对照

组:加入常规完全培养基;水飞蓟宾组:加入含43.67 μ mol/L水飞蓟宾的培养基;胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)组:加入含100 ng/mL IGF-1的培养基;共处理组:加入含43.67 μ mol/L水飞蓟宾+100 ng/mL IGF-1的培养基。各组处理24 h后提取蛋白,采用Western blotting检测PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、MMP9及TP53蛋白的表达水平。实验重复3次。

1.2.11 统计分析

本研究采用SPSS 21.0软件统计处理采集的数据。对正态分布的计量数据以($\bar{x}\pm S$)描述。两组间比较进行独立 t 检验,多组间对比进行单因素方差分析,组间成对对比进行LSD- t 检验,显著性水平设置为0.05。

2 结果

2.1 靶点预测与PPI网络构建

以“silybin”为检索词,通过Super-PRED数据库及SwissTargetPrediction数据库检索并去重后,共获得水飞蓟宾有效作用靶点100个。以“gastric cancer”为关键词,在GeneCards数据库、OMIM数据库及DrugBank数据库中检索并合并去重,共获得胃癌相关疾病靶点23 769个。将水飞蓟宾作用靶点与胃癌疾病靶点导入在线工具进行映射分析,绘制韦恩图(图1A),获得二者交集靶点92个,即为水飞蓟宾治疗胃癌的潜在作用靶点。进一步构建交集靶点的PPI网络,剔除网络中无连接关系的孤立靶点后,最终得到包含92个节点和517条边的PPI网络图(图1B)。

2.2 GO与KEGG通路富集分析结果

对水飞蓟宾治疗胃癌的92个潜在作用靶点进行GO功能富集分析。生物学过程主要涉及磷脂酰肌醇介导的信号转导、肽基酪氨酸磷酸化及内吞作用;细胞组分分析表明,交集靶点主要定位于质膜、早期内体、树突及轴突区域。分子功能注释显示,靶点基因显著富集于蛋白酪氨酸激酶活性、裂解酶活性及蛋白激酶活性等分子功能类别(图2A)。KEGG通路富集分析结果揭示,交集靶点主要参与癌症相关通路、PI3K/Akt信号通路、MAPK信号通路及HIF-1信号通路的调控(图2B)。鉴于PI3K/Akt信号通路在肿瘤发生发展过程中发挥关键调控作用,且在本研究的富集分析中呈现显著富集,后续实验选取该通路开展验证研究。

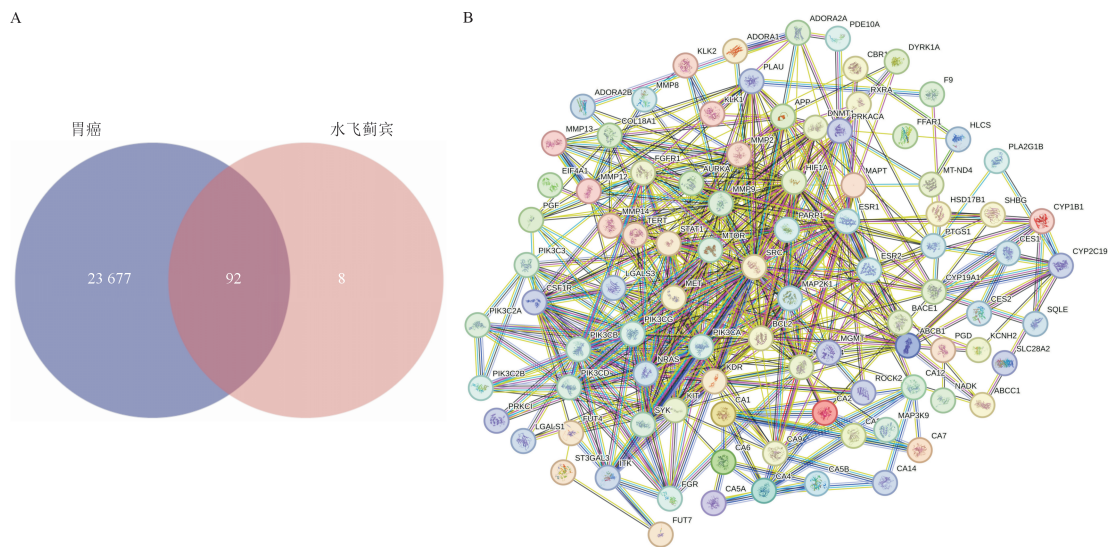


图1 水飞蓟宾与胃癌交集靶点韦恩图及蛋白质互作网络

Figure 1. Venn diagram of the intersection targets between silybin and gastric cancer and the protein-protein interaction network

注：A. 水飞蓟宾与胃癌交集靶点韦恩图；B. 蛋白质互作网络图。

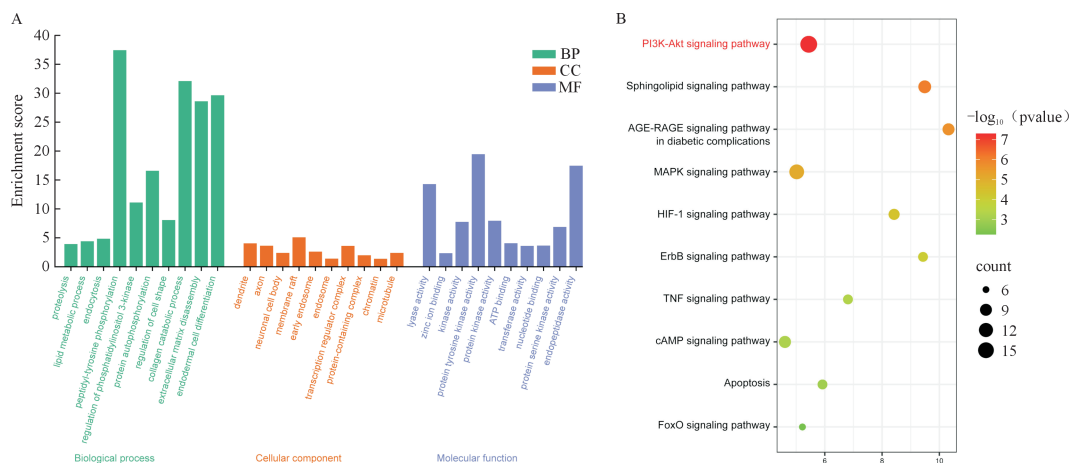


图2 水飞蓟宾-胃癌交集靶点基因本体论和京都基因与基因组百科全书通路富集分析

Figure 2. Enrichment analysis of Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway of silybin-gastric cancer overlapping targets

注：A. GO富集分析；B. KEGG通路富集分析。

2.3 实验验证

2.3.1 水飞蓟宾对AGS和HGC27细胞存活率的影响

如图3所示，水飞蓟宾对AGS细胞的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50})值为87.33 $\mu\text{mol/L}$ ，对HGC27细胞的 IC_{50} 值为87.49 $\mu\text{mol/L}$ 。提示水飞蓟宾对AGS和HGC27细胞的抑制效果和浓度正相关，其在体外能抑制肿瘤细胞的增殖，且对AGS细胞的抑制效果略优于HGC27细胞。鉴于水飞蓟宾对AGS细胞的抑制效果略优于HGC27细胞，且两者 IC_{50} 值接近，因此后续实验选择AGS细胞作为研究

对象。根据 IC_{50} 结果，选取43.67 $\mu\text{mol/L}$ ($0.5 \times IC_{50}$)、87.33 $\mu\text{mol/L}$ ($1 \times IC_{50}$)和174.66 $\mu\text{mol/L}$ ($2 \times IC_{50}$)作为低、中、高剂量组进行后续机制研究。

2.3.2 水飞蓟宾对AGS细胞增殖能力的影响

采用平板克隆形成实验评价低、中、高剂量水飞蓟宾对AGS细胞增殖活性的调控作用。与对照组相比，给药后，细胞的克隆数量减少 ($P < 0.05$)，见图4。表明给药低中高剂量均可抑制胃癌细胞增殖及克隆形成。提示其不仅抑制细胞短期增殖，还能够抑制肿瘤细胞的长期增殖和集落形成能力。

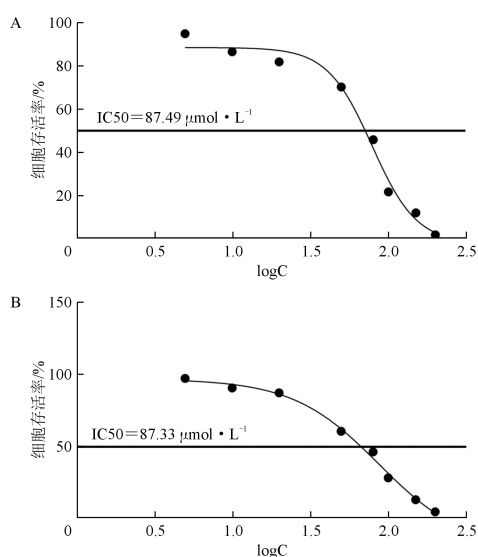


图3 水飞蓟宾对AGS和HGC27细胞增殖的抑制作用
Figure 3. Inhibitory effect of silybin on the proliferation of AGS and HGC27 cells

注：A. 对HGC27细胞的存活率影响；B. 对AGS细胞的存活率影响。

2.3.3 水飞蓟宾对AGS细胞迁移能力的影响

肿瘤的侵袭转移是导致癌症患者死亡的主要原因，而细胞迁移能力的增强是肿瘤发生侵袭转移的关键步骤，因此本研究进一步采用细胞划痕实验和Transwell实验评估水飞蓟宾对AGS细胞迁移能力的影响。结果表明，对照组、低剂

量组、中剂量组和高剂量组的细胞迁移率分别为(79.19%±0.46%)、(72.50%±0.69%)、(52.92%±0.59%)和(26.70%±1.94%)，各给药组与对照组相比差异均有统计学意义(图5A-B)。在Transwell实验中，对照组以及低、中、高剂量组穿过Transwell小室的细胞数分别为(175±15)、(112±9)、(74±5)和(30±6)个，与对照组比较，各浓度给药组差异均具有统计学意义，表明水飞蓟宾可明显削弱AGS胃癌细胞的迁移能力，且该抑制效应随药物浓度升高而增强，呈现一定的剂量-效应关系(图5C-D)。

2.3.4 水飞蓟宾抑制AGS细胞PI3/AKT信号通路

不同浓度水飞蓟宾处理AGS细胞24 h后，PI3K与AKT总蛋白表达水平与对照组比较无明显变化($P > 0.05$)，而p-PI3K及p-AKT蛋白表达水平低于对照组($P < 0.05$)，图6A-C)。MMP9蛋白表达水平随水飞蓟宾浓度增加显著下降，TP53蛋白表达水平则呈剂量依赖性上调($P < 0.05$)，图6D-E)。上述结果表明，水飞蓟宾可能通过抑制PI3K/AKT信号通路磷酸化激活，下调MMP9并上调TP53表达，进而抑制胃癌细胞增殖与迁移。

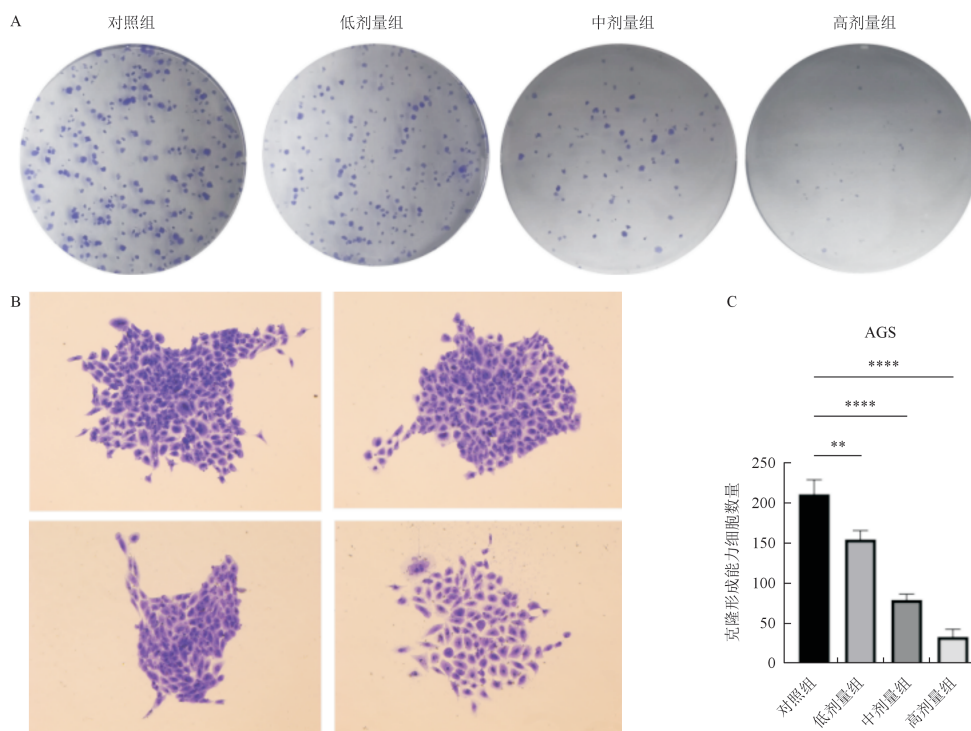


图4 水飞蓟宾对AGS细胞克隆形成能力的影响

Figure 4. Effect of silybin on colony formation ability of AGS cells

注：A. 水飞蓟宾不同剂量分组；B. 不同剂量水飞蓟宾对AGS细胞作用染色图；C. 不同剂量水飞蓟宾对AGS细胞作用图；与对照组相比，* $P < 0.05$ 。

2.3.5 胰岛素样生长因子-1 逆转水飞蓟宾对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用

单独水飞蓟宾处理组 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.05$, 图 7B-C); 同时, 下游 MMP9 蛋白表达显著下调, 而 TP53 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$, 图 7D-E)。IGF-1 与水飞蓟宾共处理组的 p-PI3K、p-AKT

及 MMP9 蛋白表达水平显著高于水飞蓟宾单独处理组 ($P < 0.05$), 而 TP53 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。该结果表明, IGF-1 能够部分逆转水飞蓟宾对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用及其下游效应蛋白的表达变化, 进一步提示水飞蓟宾通过抑制 PI3K/AKT 信号通路发挥抗胃癌作用。

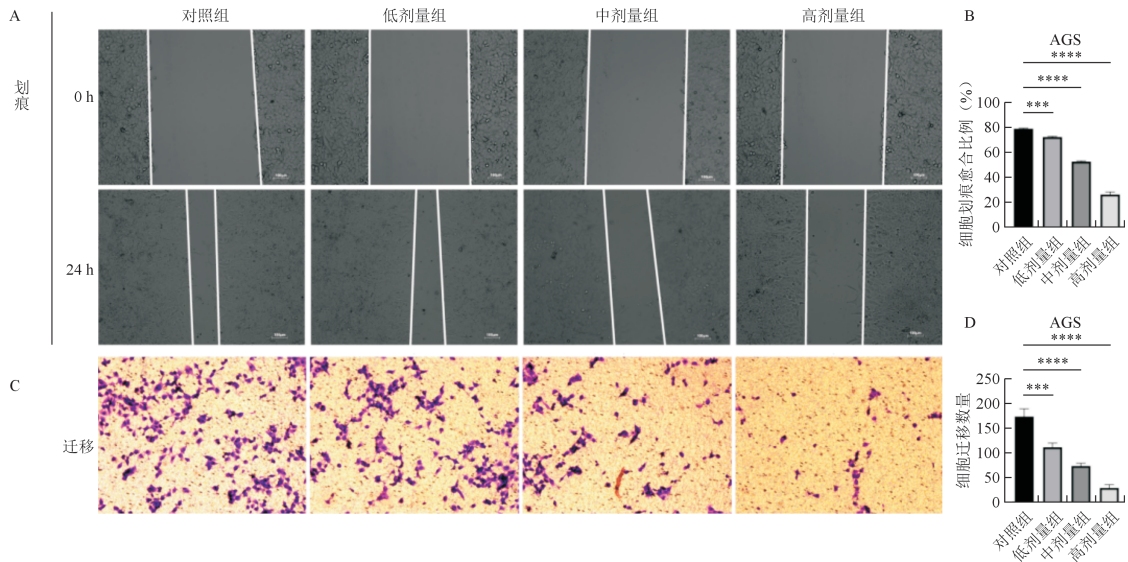


图5 水飞蓟宾对 AGS 细胞迁移能力的影响

Figure 5. Effect of silybin on the migration ability of AGS cells

注: A、B 为细胞浓度实验; C、D 为 Transwell 实验结果; 与对照组相比, $*P < 0.05$ 。

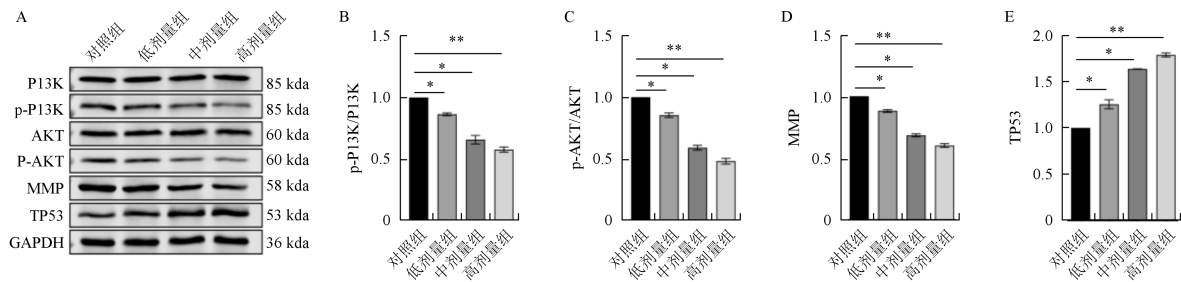


图6 水飞蓟宾对 AGS 细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

Figure 6. Effects of silybin on PI3K/AKT signaling pathway-related protein expression in AGS cells

注: 纵坐标为蛋白相对灰度值 (以 GAPDH 为内参), 代表蛋白相对表达水平; $*P < 0.05$, 与对照组比较。

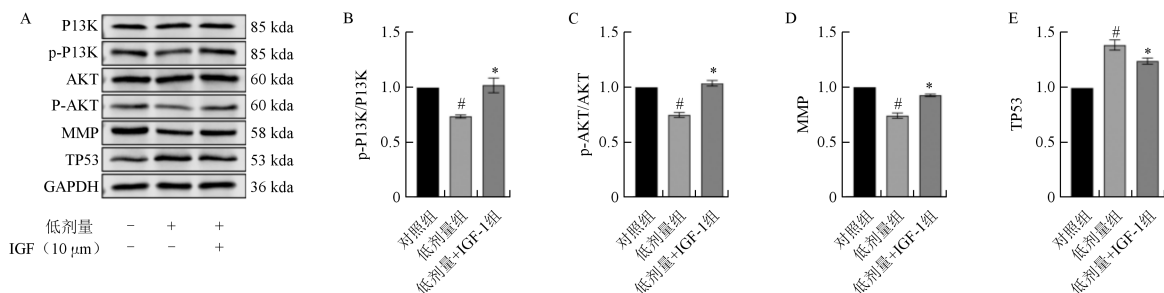


图7 胰岛素样生长因子-1 逆转水飞蓟宾对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用

Figure 7. IGF-1 reverses the inhibitory effect of silybin on the PI3K/AKT signaling pathway

注: 纵坐标为蛋白相对灰度值 (以 GAPDH 为内参), 代表蛋白相对表达水平; $*P < 0.05$, 与对照组比较; $\#P < 0.05$, 与水飞蓟宾低剂量组比较。

3 讨论

胃癌是全球第五大常见恶性肿瘤和第三大癌症死亡原因^[12]。尽管外科手术技术、化疗方案和靶向治疗药物不断进步,胃癌患者的整体5年生存率仍徘徊在40%~45%^[13]。传统化疗药物虽能在一定程度上控制肿瘤生长,但其严重的毒副作用和耐药性问题限制了临床应用^[14]。探索疗效确切且安全性良好的新型抗胃癌药物已成为该领域亟待解决的关键问题。天然产物因其结构多样性、生物活性广泛性和相对较低的毒性,在抗肿瘤药物研发领域备受关注^[15]。水飞蓟宾作为从菊科植物水飞蓟种子中提取的主要活性成分,已在保肝、抗氧化、抗炎等相关研究中得到广泛应用,但其抗胃癌作用及分子机制尚未完全阐明^[7]。

近年来,网络药理学的兴起为天然产物的作用机制研究提供了全新的视角和方法学支撑^[16]。网络药理学分析表明,PI3K/Akt信号通路显著富集且排名靠前。PI3K/AKT信号通路是细胞内最为重要的信号转导系统之一,几乎参与调控细胞生命活动的所有关键环节,包括细胞生长、增殖、分化、凋亡、迁移、血管生成及代谢重编程等^[17]。该通路的激活始于细胞表面受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs)或G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)的活化,随后招募并激活PI3K,催化生成第二信使PIP3,进而激活下游的AKT激酶^[18]。活化的AKT通过磷酸化众多底物蛋白,如mTOR、GSK3 β 、FoxO家族转录因子、P53等,从而调控细胞的多种生物学行为^[19]。在正常生理状态下,该通路受到PTEN等磷酸酶的严格负调控,维持在适度激活水平。然而,在多种恶性肿瘤中,由于PTEN失活突变、PI3K或AKT基因扩增/突变、RTKs过度表达等原因,PI3K/AKT通路常呈现持续性异常激活^[20]。在胃癌中,PI3K/AKT通路的异常激活与肿瘤的发生、进展、侵袭转移、血管生成及化疗耐药性均存在密切关联^[21-22]。研究显示,约30%~60%的胃癌患者存在PI3K/AKT通路的异常激活,且通路激活水平与肿瘤分期、淋巴结转移、预后不良显著相关^[23]。此外,TP53与AKT在胃癌发展中协同作用,TP53降低导致细胞周期失控,AKT过度激活则促进细胞存活和抗凋亡特性,二者共同驱动胃癌的恶性进展。因此,靶向抑制PI3K/AKT通路已成为胃癌治疗的重要策略。

AGS细胞源自人胃腺癌,分化程度中等、增殖与迁移能力较强,是研究PI3K/AKT通路介导的胃癌增殖与迁移的经典细胞模型;HGC27细胞系为低分化/未分化型胃癌细胞,侵袭性强,与AGS细胞代表胃癌不同分化表型。有助于增强实验结论的普适性,故作为本研究的实验对象。实验结果证实,水飞蓟宾能够有效抑制AGS及HGC27两株胃癌细胞的增殖活性,且抑制效果较显著,且水飞蓟宾不仅抑制细胞的短期增殖,还能显著抑制肿瘤细胞的克隆形成能力。克隆形成能力反映了单个肿瘤细胞在体外无限增殖形成集落的能力,也是评估肿瘤细胞干性和自我更新潜能的重要指标^[24]。水飞蓟宾对克隆形成的抑制作用提示其可能影响肿瘤干细胞样特性,对于防止肿瘤复发和转移具有重要意义。在分子机制层面,Western blotting结果显示,水飞蓟宾呈剂量依赖性降低p-PI3K和p-AKT蛋白表达,而对PI3K和AKT总蛋白水平无明显影响,表明水飞蓟宾主要通过抑制PI3K/AKT通路的磷酸化激活发挥作用,而非下调通路蛋白的总体表达。本研究进一步检测了该通路的两个重要下游效应分子MMP9和TP53的表达变化。MMP9是PI3K/AKT通路调控的关键靶基因,其过度表达可降解细胞外基质,特别是IV型胶原和明胶,从而破坏基底膜的完整性,促进肿瘤细胞侵袭和转移。在胃癌中,MMP9的高表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及患者不良预后之间存在显著相关性。研究表明,肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)分泌的MMP9可通过激活PI3K/AKT/Snail信号通路诱导上皮-间质转化过程,进而促进胃癌的远处转移。水飞蓟宾处理显著下调MMP9蛋白表达,这与PI3K/AKT通路抑制相一致,进一步提示水飞蓟宾可能通过减少ECM降解和抑制EMT过程来抑制胃癌细胞的迁移和侵袭能力。

本研究仍存在一定局限性:首先,仅在体外细胞水平验证水飞蓟宾抗胃癌作用,缺乏体内动物模型的药效学及安全性验证;其次,仅通过通路抑制实验初步证实PI3K/AKT信号通路为关键靶点,未开展基因过表达或沉默实验进行反向验证;此外,未系统考察水飞蓟宾对胃癌细胞凋亡、周期、侵袭等生物学行为的影响,机制研究维度较单一。针对上述不足,后续将进一步完善:构建胃癌裸鼠移植瘤模型,在体内验证水飞蓟宾的抑瘤效果及对PI3K/AKT通路的调控作用;

采用基因过表达/沉默技术,反向验证 PI3K/AKT 通路在水飞蓟宾抗胃癌中的核心作用;系统检测水飞蓟宾对胃癌细胞凋亡、周期分布及侵袭能力的影响,全面阐明其抗胃癌分子机制。

综上所述,网络药理学预测与实验验证结果一致表明,水飞蓟宾的抗胃癌活性主要依赖于 PI3K/AKT 信号通路的抑制。然而,本研究仅基于体外细胞实验,其在体内环境中对胃癌细胞增殖与转移的抑制效果及具体机制有待进一步阐明。

参考文献

- 1 宁思明,杨瑞霞,晋亚楠,等. 1990—2021年中国胃癌疾病负担研究及年变化趋势分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2025, 36(4): 17–21. [Ning SM, Yang RX, Jin YN, et al. Disease burden and annual change trends of gastric cancer in China in 1990–2021 [J]. Public Health and Preventive Medicine, 2025, 36(4): 17–21.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-2483.2025.04.004.
- 2 Petersen CP, Weis VG, Nam KT, et al. Macrophages promote progression of spasmodic polypeptide-expressing metaplasia after acute loss of parietal cells[J]. Gastroenterology, 2014, 146(7): 1727–38.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.007.
- 3 Van Den Ende T, Ter Veer E, Mali RMA, et al. Prognostic and predictive factors for the curative treatment of esophageal and gastric cancer in randomized controlled trials: a systematic review and Meta-analysis[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(4). DOI: 10.3390/cancers11040530.
- 4 Eusebi LH, Telese A, Marasco G, et al. Gastric cancer prevention strategies: a global perspective[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2020, 35(9): 1495–502. DOI: 10.1111/jgh.15037.
- 5 Janeczko M, Kochanowicz E. Silymarin, a popular dietary supplement shows anti-candida activity[J]. Antibiotics (Basel), 2019, 8(4). DOI: 10.3390/antibiotics8040206.
- 6 Firuzi O, Khajehzadei S, Ezzatzadegan S, et al. Effects of silymarin on biochemical and oxidative stress markers in end-stage renal disease patients undergoing peritoneal dialysis[J]. Hemodial Int, 2016, 20(4): 558–63. DOI: 10.1111/hdi.12413.
- 7 Zappavigna S, Vanacore D, Lama S, et al. Silybin-induced apoptosis occurs in parallel to the increase of ceramides synthesis and mirnas secretion in human hepatocarcinoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9). DOI: 10.3390/ijms20092190.
- 8 Fu J, Liu W, Liu S, et al. Inhibition of YAP/TAZ pathway contributes to the cytotoxicity of silibinin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Cell Signal, 2024, 119: 111186. DOI: 10.1016/j.cellsig.2024.111186.
- 9 Singh N, Ali M, Biswal P, et al. Inhibition of growth and survival of head and neck cancer cells by silibinin involves the down-regulation of Erk1/2, AKT and STAT3 signaling[J]. Mol Carcinog, 2025, 64(10): 1735–50. DOI: 10.1002/mc.70022.
- 10 Bittencourt MLM, Rodrigues RP, Kitagawa RR, et al. The gastroprotective potential of silibinin against helicobacter pylori infection and gastric tumor cells[J]. Life Sci, 2020, 256: 117977. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117977.
- 11 Luo TT, Lu Y, Yan SK, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: methodology, application and prospective[J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(1): 72–80. DOI: 10.1007/s11655-019-3064-0.
- 12 Sung H, Ferlay J, Siegel R, 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): 209–49. DOI: 10.3322/caac.21660.
- 13 Li Y, Feng A, Zheng S, et al. Recent estimates and predictions of 5-year survival in patients with gastric cancer: a model-based period analysis[J]. Cancer Control, 2022, 29: 10732748221099227. DOI: 10.1177/10732748221099227.
- 14 Wagner AD, Syn NL, Moehler M, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 8(8): Cd004064. DOI: 10.1002/14651858.CD004064.pub4.
- 15 Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(3): 200–16. DOI: 10.1038/s41573-020-00114-z.
- 16 Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682–90. DOI: 10.1038/nchembio.118.
- 17 Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(12): 988–1004. DOI: 10.1038/nrd1902.
- 18 Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(3): 195–203. DOI: 10.1038/nrm3290.
- 19 Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. Cell, 2007, 129(7): 1261–74. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- 20 Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(8): 550–62. DOI: 10.1038/nrc2664.
- 21 Tapia O, Riquelme I, Leal P, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential prognostic and predictive significance[J]. Virchows Arch, 2014, 465(1): 25–33. DOI: 10.1007/s00428-014-1588-4.
- 22 Matsuoka T, Yashiro M. The role of PI3K/Akt/mTOR signaling in gastric carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2014, 6(3): 1441–63. DOI: 10.3390/cancers6031441.
- 23 Yu G, Wang J, Chen Y, et al. Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(7): 695–702. DOI: 10.1007/s10585-008-9178-y.
- 24 Franken NA, Rodermond HM, Stap J, et al. Clonogenic assay of cells in vitro[J]. Nat Protoc, 2006, 1(5): 2315–9. DOI: 10.1038/nprot.2006.339.

收稿日期: 2025 年 12 月 17 日 修回日期: 2026 年 03 月 08 日

本文编辑: 沈力 黄笛

引用本文: 米佳丽, 石磊, 王丽娜, 等. 基于系统网络药理学分析水飞蓟宾治疗胃癌的作用机制[J]. 数理医药学杂志, 2026, 39(6): 445–453. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202603065.

Mi JL, Shi L, Wang LN, et al. The mechanism of silybin in treating against gastric cancer based on systematic network pharmacology analysis[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2026, 39(6): 445–453. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202603065.