

基于网络药理学、分子对接及实验探究芹菜素抗胃癌作用

毛丽旦·马合提江, 王俊龙, 热合巴提·努尔夏提, 李紫薇

Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Experiments to Explore the Anti-gastric Cancer Effect of Apigenin

MAHETIJANG · Maolidan, WANG Junlong, NUERXIATI · Rehebat, and LI Ziwei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110270>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学及分子对接探究荷叶生物碱抗高尿酸血症的作用机制

Action Mechanism of *Nelumbo nucifera* Leaf Alkaloids in the Treatment of Hyperuricemia Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

食品工业科技. 2024, 45(17): 10-20 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110189>

基于网络药理学及分子对接技术探讨辣木叶抗肥胖的作用机制

Study on the Anti-obesity Mechanism of Action of *Moringa oleifera* Lam. Leaves by Network-Based Pharmacology and Molecular Docking Techniques

食品工业科技. 2023, 44(15): 34-45 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022090318>

基于网络药理学与分子对接探讨沙棘抗肥胖作用机制

Exploring the Mechanism of Hippophae Fructus Anti-obesity through Network Pharmacology and Molecular Docking

食品工业科技. 2024, 45(6): 1-11 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060160>

基于网络药理学与分子对接和实验验证探讨费菜抗炎作用的分子机制

Molecular Mechanism of *Phedimus aizoon* (Linnaeus)'t Hart. on Anti-inflammatory Effect Based on Network Pharmacology and Molecular Docking and Experiment Research

食品工业科技. 2023, 44(4): 12-21 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050178>

基于网络药理学和分子对接探究黄芪-女贞子治疗免疫缺陷病的作用机制

Mechanism of *Astragalus-Ligustrum lucidum* in the Treatment of Immunodeficiency Diseases Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

食品工业科技. 2022, 43(3): 374-383 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021060024>

基于网络药理学及分子对接技术探讨绞股蓝防治肥胖的作用机制

Mechanism of *Gynostemma pentaphyllum* on Prevention and Treatment of Obesity Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

食品工业科技. 2022, 43(4): 12-23 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070083>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

毛丽旦·马合提江, 王俊龙, 热合巴提·努尔夏提, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验探究芹菜素抗胃癌作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 368–377. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110270

MAHETIJIANG·Maolidan, WANG Junlong, NUERXIATI·Rehebat, et al. Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Experiments to Explore the Anti-gastric Cancer Effect of Apigenin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 368–377. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110270

· 营养与保健 ·

基于网络药理学、分子对接及实验探究芹菜素抗胃癌作用

毛丽旦·马合提江, 王俊龙, 热合巴提·努尔夏提, 李紫薇*

(伊犁师范大学化学化工学院, 新疆生物质资源清洁转化与高值利用重点实验室, 新疆伊宁 835000)

摘要:目的: 基于网络药理学与分子对接技术结合 CCK8 法、细胞划痕、细胞侵袭、平板克隆形成实验探讨芹菜素治疗胃癌作用。方法: 本文通过 ChEMBL、UniProt、GeneCards 等数据库及 jvenn 获得芹菜素治疗胃癌的潜在靶点, 结合蛋白质相互作用 (PPI) 分析, 基因本体 (GO) 富集分析、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析进行作用机制探讨, 进一步采用 Auto dock 软件进行分子对接, 最后通过细胞增殖与毒性实验 (Cell counting kit-8, CCK8) 验证芹菜素对胃癌细胞的抑制作用。结果: 芹菜素治疗胃癌潜在作用靶点为 52 个; GO 分析表明, 芹菜素抗胃癌机制可能与调节信号传导、化学突触传递、蛋白水解等有关; KEGG 分析发现其通过调节神经活性配体-受体相互作用、氮代谢等信号通路发挥抗癌作用; 分子对接结果显示配体和受体的结合能为 $ACHE| -9.1| > MAOA| -8.8| > CA2| -7.4| > DPP4| -7.3| > CA1| -7.2| = GRM5| -7.2| > ADA| -6.8| > CASP3| -5.8|$, 表明配体和受体具有良好的结合性。体外实验表明, 芹菜素对胃癌细胞系有明显的抑制作用, 其可能是通过降低 *MAOA*、*DPP4*、*AChE* 的表达, 升高 *CA2* 的表达对胃癌起到抑制作用。结论: 芹菜素具有抗胃癌的作用, 其发挥作用涉及到的主要靶点有 *AChE*、*CA1*、*CA2*、*CASP3*、*ADA*、*MAOA*、*DPP4*、*GRM5*, 展现了芹菜素多成分、多靶点、多途径的优点, 为后续研究芹菜素抗胃癌作用提供参考。

关键词: 网络药理学, 分子对接, 芹菜素, 胃癌

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)21-0368-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110270

本文网刊:



Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Experiments to Explore the Anti-gastric Cancer Effect of Apigenin

MAHETIJIANG·Maolidan, WANG Junlong, NUERXIATI·Rehebat, LI Ziwei*

(Xinjiang Key Laboratory of Clean Transformation and High Value Utilization of Biomass Resources, School of Chemistry and Chemical Engineering, Yili Normal University, Yining 835000, China)

Abstract: Objective: Network pharmacology, molecular docking technology, and CCK8, wound healing, cell invasion, plate colony formation assay were used to explore the effect of apigenin in the treatment of gastric cancer. Methods: The ChEMBL, UniProt, and GeneCards databases and jvenn tools were used to obtain the potential anticancer targets of apigenin. Then, the PPI network analysis, gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of key targets were used to investigate the mechanism, and Auto dock software was used for further molecular docking. Lastly, the inhibitory effect of apigenin on gastric cancer cells was verified through cell counting kit-8 (CCK8) experiments. Results: There were 52 potential targets of apigenin in the treatment of gastric cancer. GO analysis showed that apigenin might exert its anti-gastric cancer mechanism by regulating signal transduction, chemical synaptic transmission, and proteolysis. KEGG analysis showed that apigenin played a role by

收稿日期: 2023-11-26

基金项目: 新疆生物质资源清洁转化与高值利用重点实验室资助项目 (XJSWZ202401); 自治区重点研发计划项目课题 (2022B02021-1-2)。

作者简介: 毛丽旦·马合提江 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物分析, E-mail: mld5177@163.com。

* 通信作者: 李紫薇 (1970-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然产物分析, E-mail: yili92@163.com。

regulating the neural active ligand receptor interaction, nitrogen metabolism and other signaling pathways. The molecular docking results showed that the binding energy of ligand and receptor was: *AChE*[-9.1]>*MAOA*[-8.8]>*CA2*[-7.4]>*DPP4*[-7.3]>*CA1*[-7.2]=*GRM5*[-7.2]>*ADA*[-6.8]>*CASP3*[-5.8], indicating that the ligand and receptor had good binding affinity. *In vitro* tests exhibited that apigenin possessed significant inhibitory effect on gastric cancer cell lines, which might be due to its ability to reducing the expression of *MAOA*, *DPP4*, *AChE* and increasing the expression of *CA2*. Conclusion: Apigenin has the effect of anti-gastric cancer, and the main targets involved in its effect are *AChE*, *CA1*, *CA2*, *CASP3*, *ADA*, *MAOA*, *DPP4*, *GRM5*, which shows the advantages of apigenin in multi-component, multi-target, and multi-channel, and provides a reference for the follow-up study of the anti-gastric cancer effect of apigenin.

Key words: network pharmacology; molecular docking; apigenin; gastric cancer

胃癌(Gastric cancer, GC)是一种源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,在我国各种恶性肿瘤中发病率居首位^[1],目前,手术和化疗是常用的治疗方法,但在临床治疗的过程中,大多数抗癌药物具有严重的不良反应,长时间使用会产生一定的耐药性,甚至会发生并发症。因此,研发副作用小,治疗效果好的新型抗胃癌药物具有重要的现实意义。目前,从天然植物中筛选出特异性强的新型靶向抗肿瘤药物,已成为研究开发抗肿瘤药物的重要途径。

芹菜素(Apigenin)为 4,5,7—三羟基黄酮,又称为芹黄素、洋芹素,是一种来源于伞型科植物的小分子可食用^[2]黄酮类化合物,纯品为黄色晶体状粉末^[3]。常见的含有芹菜素的果蔬有猕猴桃、葡萄柚、金桔、芹菜、香菜、甘蓝、薄荷等,其中香菜中的芹菜素是芹菜中的 180 倍^[4-5]。芹菜素不仅存在于水果和蔬菜中,还存在于各类中草药中,如蒲公英^[6]、洋甘菊^[7]、芫花^[8]。据文献报道,芹菜素具有降糖^[9]、降压^[10]、抗炎^[11]、抗氧化^[12]、抑菌^[13]等功效。目前,研究发现,芹菜素能够调控多种肿瘤细胞的生物行为,能够阻滞细胞周期、促进细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的侵袭与迁移,且具有毒性小、致突变作用低等优势^[5-6]。林沈国等^[14]研究表明芹菜素可以通过抑制细胞增殖、凋亡和分化来抑制乳腺癌。崔昭阳等^[15]用芹菜素对人胃癌细胞 SGC-7901 做了研究,芹菜素通过激活死亡受体参与诱导并对胃癌有一定的治疗作用。崔迎红等^[16]研究了芹菜素对肝癌的作用。目前芹菜素在胃癌中的作用机制研究鲜有报道。

网络药理学作为药理学的一个新领域,是基于主成分通过系统生物学理论构建疾病生物靶点和药物成分之间的网络联系,从而获得治疗疾病的有效成分^[17],是一门基于系统生物学理论、生物系统网络分析和多目标药物分子设计特定信号节点选择的新学科。中医药配方的作用机制具有多个目标和水平的特点。该机制类似于网络药理学的完整性、系统化和全面性,因此网络药理学适合研究中药化合物的药理学机制^[18]。

鉴于此,本研究采用网络药理学与分子对接筛选活性成分芹菜素抗胃癌的靶点,对抗人胃癌细胞(AGS、MGC-803)的生物过程与分子机制进行全面阐述并进一步挖掘抗胃癌的关键基因,为以后研究芹

菜素提供新的思路和理论数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人胃癌细胞系 AGS、MGC-803 湖州市中心医院细胞库;芹菜素标准品(分析纯) 上海阿拉丁生化科技公司;RPMI-1640 培养液、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS) 美国 Hyclone 公司;磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffered saline, PBS) 白鲨生物科技有限公司;0.25% 胰酶、青-链霉素双抗(Penicillin-streptomycin, PS) 美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒、异丙醇、氯仿、多聚甲醛、结晶紫染料 南京诺唯赞生物科技有限公司;Trizol 福州科净生物科技有限公司;Transwell 细胞小室 耐思生物科技有限公司。

Heracell Vios 160i CR 二氧化碳培养箱、Multiskan FC 多功能酶标仪、Sorvall LYNX 6000 高速冷冻离心机、ABI7500 荧光定量 PCR 仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Primo Vert 倒置相差显微镜 德国蔡司公司。

1.2 实验方法

1.2.1 数据库平台 通过网络药理学分析芹菜素抗胃癌的作用,采用的数据库及网址见表 1。

1.2.2 芹菜素及胃癌相关靶点的预测 以“Apigenin”为关键词在 ChEMBL 数据库中搜索靶蛋白信息,在 UniProt 数据库中将找到的靶点统一转化为基因名。将相关信息导出建立芹菜素靶蛋白列表。以“Gastric cancer”为关键词检索 GeneCards 数据库,将获得的基因名称等相关信息导出建立胃癌靶基因列表,用于后续分析。

1.2.3 PPI 网络的构建及构建成分网络靶点图 将 1.2.2 中得到的芹菜素与胃癌相关靶点输入到 jvenn 中,获得二者的交集靶点。将共同的靶点输入到 STRING 数据库中,选择“Homo sapiens”,设置相互信值 0.400,隐藏游离的靶点,得到 PPI 网络。把下载得到的结果导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中,构建芹菜素与胃癌的网络关系图,并设置 between 来选取核心靶点,并调整靶点位置使之更清晰。

1.2.4 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析 将所收集到的交叉靶点导入到 David 数据库中,分别得到生物过程(Biological process, BP)、细胞组成

表 1 网络药理学分析的参照数据库及网址

Table 1 Database and website for network pharmacology analysis

数据库	名称	网址
ChEMBL	药物化学数据库	https://www.ebi.ac.uk/chembl/
GeneCards	人类基因综合数据库	https://www.genecards.org
UniProt	蛋白质信息数据库	https://www.uniprot.org
jvenn	在线韦恩图	https://jvenn.toulouse.inrae.fr/
STRING	蛋白互作数据库	https://cn.string-db.org
David	注释、可视化和综合发现数据库	https://david.ncifcrf.gov
PDB	国际蛋白质结构数据库	https://www.rcsb.org
Bioinformatics	微生物数据平台	http://www.bioinformatics.com.cn

(Cellular component, CC)、分子功能(Molecular function, MF)及信号通路的靶点信息。将这些数据下载并选择前 25 个核心靶点,导入到微生物平台,通过 GO 富集分析绘制气泡图和信号通路。

1.2.5 分子对接 1.2.3 中得到的核心靶点前八位,在 PDB 数据库中查找靶蛋白的 pdb 格式,导入至 Pymol 软件中进行去除小分子和水的预处理,后导入至 Autodock Tools 中加氢,导出为 pdbqt 格式。在 Chem 数据库中搜索并下载芹菜素的 3D 结构为 mol2 格式,在 Pymol 软件中导出为 pdbqt 格式。使用 Autodock Vina 将二者进行对接,取结合能绝对值最高的并用 Pymol 做可视化分析。

1.2.6 体外实验 细胞株用含有 10% 的 RPMI-1640 培养液,置于 37 ℃、5% CO₂,饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.6.1 CCK-8 法检测细胞活力 取细胞汇合度达到 80% 对数生长期的胃癌细胞(AGS, MGC-803),使用细胞计数仪计数,细胞计数后,以 4×10⁴/孔的密度接种于 96 孔板中(100 μL/孔),96 孔板边缘一圈加入 PBS,避免受到蒸发影响结果;在培养箱中培养 24 h 后,弃去旧培养基,加入 10% 血清的 1640 培养液培养,培养箱条件为 37 ℃、5% CO₂,孵育 4 h。空白对照组:加 10% 血清的 1640 完全培养基;实验组:不同浓度的芹菜素标准液(1、2、4、8、16、32 μmol/L),培养时间为 24 h;24 h 后从培养箱中取出 96 孔板,并向其中加入 CCK-8 试剂(0.5 mg/mL)100 μL,继续孵育 2~4 h,颜色明显变化后,测 450 nm 处的吸光度。

$$\text{细胞生存率(\%)} = \left(\frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \right) \times 100$$

式中: A_s 为实验孔吸光度(含细胞、培养液、CCK-8 溶液和药物溶液); A_c 为对照孔吸光度(含细胞、培养液、CCK-8 溶液,不含药物); A_b 为空白孔吸光度(含培养液、CCK-8 溶液,不含细胞、药物)。

1.2.6.2 细胞划痕法检测细胞愈合能力 取对数生长期的胃癌细胞(AGS, MGC-803),以每孔 5×10⁵ 接种于 6 孔板中,37 ℃、5% CO₂ 下培养 24 h;24 h 后,吸去培养基,在细胞培养皿上制造划痕,同时设置无芹菜素溶液的完全培养基为对照组,以及不同浓度芹

菜素溶液的培养基组,使用 8 μmol/L 和 16 μmol/L 的芹菜素分别干预 AGS 和 MGC-803 细胞,经 24 h 给药培养并划痕,分别在 0、24 h 拍照进行比较。设计三组重复实验。

1.2.6.3 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 将处于对数生长期的细胞,吸去培养基,加磷酸缓冲盐溶液清洗,加胰酶消化,加入 1640 培养液终止消化,200×g 离心 5 min;弃去上清,加入 1640 培养液重悬细胞,进行细胞计数,约每孔 5×10⁵;在 12 孔板中加入 500 μL 含 10% FBS 的 1640 培养液,放入 Transwell 细胞小室,上室加入 200 μL 细胞悬液,静置 15 min,避免细胞脱落,沉降。静置后再往上室中分别加入 8 μmol/L 和 16 μmol/L 芹菜素的无血清培养液,再将 12 孔板轻放入培养箱中培养 24 h;24 h 后,取出 Transwell 小室吸走培养液, PBS 洗三次。在 12 孔板的干净孔中加入 4% 多聚甲醛 2 mL,小室底面浸入溶液中固定 10~15 min;吸去液体,将 Transwell 小室在盛有 PBS 的 6 cm 皿中刷洗三遍,不能碰到小室底部。将小室底部浸入结晶紫染色 5~10 min(每孔 1 mL)。纯净水洗小室,用棉签轻轻擦拭小室的上室,除去未与细胞结合的结晶紫;载玻片上加少量 PBS,再将 Transwell 小室放上去,滴加 PBS。在显微镜下取 8 个视野观察细胞并计数,进行比较。

1.2.6.4 平板克隆实验检测细胞的增殖能力 将处于对数生长期的细胞胰酶消化后,完全培养基(基础培养基+10% 胎牛血清)重悬成细胞悬液,并计数;细胞接种于 6 孔板培养板中,各实验组接种 800 个细胞/孔;继续培养到 14 d 或绝大多数单个克隆中细胞数大于 500 为止,中途每隔 3 d 进行换液并观察细胞状态;克隆完成后,在显微镜下对细胞进行拍照,然后 PBS 洗涤 1 次,每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 30~60 min, PBS 洗涤 1 次;每孔加入结晶紫染液 1 mL,染色细胞 10~20 min; PBS 洗涤细胞数次,晾干,分别对整个 6 孔板及每个孔进行单独拍照。

1.2.6.5 RT-qPCR 法检测基因表达 引物设计:下列引物基因由北京擎科生物科技股份有限公司(上海)进行合成。表 2 列出了引物的序列。

RNA 提取:使用 AGS 细胞和 MGC-803 细胞铺于 6 孔板中,24 h 后分别给予 8、16 μmol/L 的芹菜

Cytoscape 是一款可以将数据可视化的软件。将芹菜素与胃癌的相交靶点导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中, 构建成分—靶点网络图。筛选出“Betweenness”值大于 200 的靶点, 最终得到芹菜素与胃癌相交靶点: *ACHE*、*CASP3*、*CAI*、*CA2*、*DPP4*、*ADA*、*GRM5*、*MAOA*, 共八个。成分靶点网络图见图 2。

2.3 Go 功能富集和 KEGG 通路富集分析

图 3 展示了芹菜素治疗胃癌的作用靶点 GO 功

能富集结果。这些靶点参与信号传导、化学突触传递、蛋白水解、单碳代谢过程、质膜组成、质膜、突触后膜、配体门控离子通道活性、神经递质受体活性、氧化还原酶的活动等过程。

KEGG 通路富集结果如图 4 所示, 神经活性配体—受体相互作用、氮代谢、钙信号通路、代谢途径、神经退行性变的途径—多重疾病、阿尔茨海默病、色氨酸代谢、胆碱能突触、cAMP 信号通路、酒精性肝病、胃酸分泌、酗酒等信号通路有靶点的富

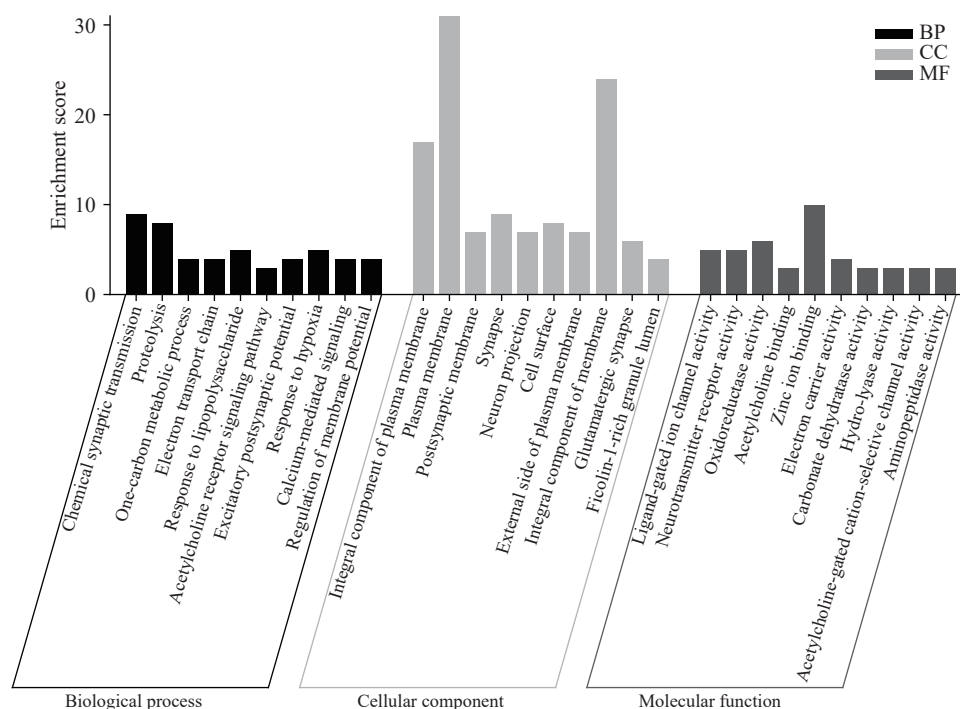


图 3 芹菜素抗胃癌靶点的 GO 分析

Fig.3 GO analysis of apigenin anti-gastric cancer targets

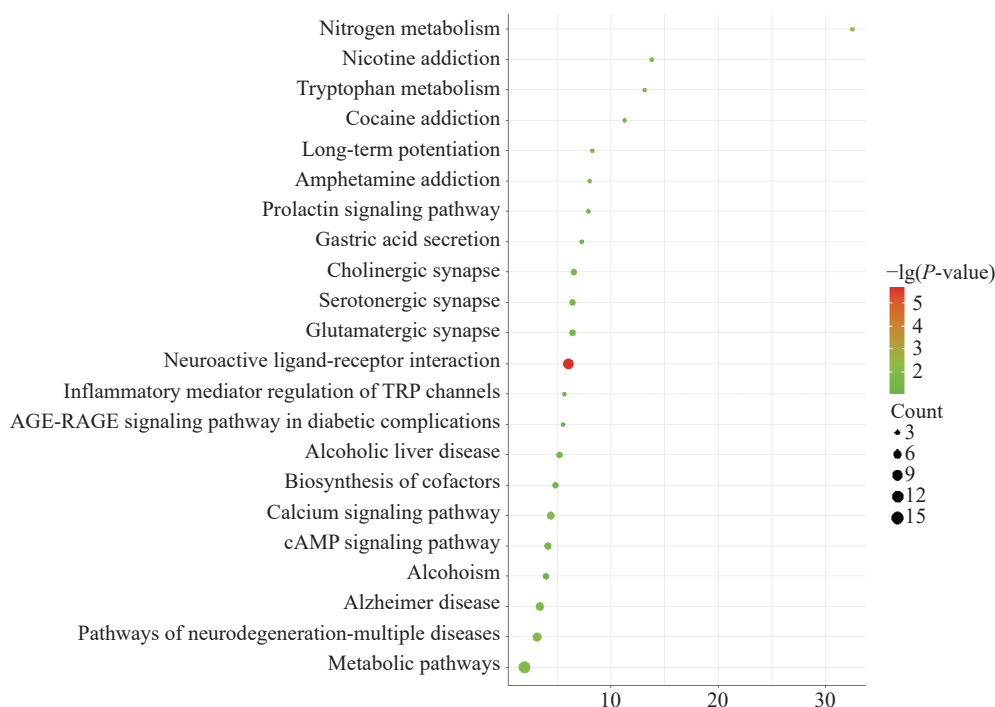


图 4 芹菜素抗胃癌关键靶点的 KEGG 通路富集

Fig.4 KEGG pathway enrichment of apigenin anti-gastric cancer key targets

集。有相关研究发现,化学突触相关的通路 P 值越低,癌症存活率越小^[19]。其中神经递质参与了多种恶性肿瘤的发生与发展^[20],胆碱能信号抑制 Wnt 信号通路和干细胞的扩增,进而阻断胆碱能抑制胃癌的发生^[21]。

2.4 分子对接

胃癌与芹菜素分子对接结果如表 4 所示,分子结合能绝对值的高低反映结合能力的强弱,绝对值排名为: $AChE$ [-9.1]> $MAOA$ [-8.8]> $CA2$ [-7.4]> $DPP4$ [-7.3]> $CA1$ [-7.2]= $GRM5$ [-7.2]> ADA [-6.8]> $CASP3$ [-5.8],可知与芹菜素结合紧密。表明芹菜素与胃癌中的以上靶点具有良好的结合能力,分子对接如图 5 所示。

表 4 胃癌靶点与芹菜素分子对接结果

Table 4 Results of molecular docking between gastric cancer targets and apigenin

靶点	结合能(kcal/mol)
$AChE$	-9.1
$CASP3$	-5.8
$CA1$	-7.2
$CA2$	-7.4
$DPP4$	-7.3
$MAOA$	-8.8
ADA	-6.8
$GRM5$	-7.2

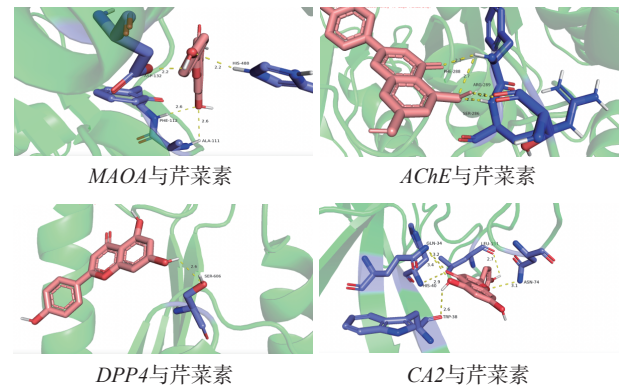


图 5 分子对接图

Fig.5 Molecular docking diagram

2.5 体外实验

2.5.1 芹菜素对人胃癌细胞生存率的影响 芹菜素常见于我们日常的食物里,主要以糖苷的形式存在。多项研究表明,芹菜素通过激活和抑制不同的细胞信号和分子来调节各种细胞过程,包括血管生成、凋亡、转移、自噬、细胞周期和免疫反应^[22]。CCK-8 检测细胞生存率在药物毒性检验、肿瘤细胞增殖等多个领域的研究中已经有所应用^[23]。如图 6 所示,不同浓度的芹菜素处理的 AGS 细胞与 MGC-803 细胞的细胞活性呈剂量反比,芹菜素的浓度越高,细胞的生存率越低。通过各组之间比较得出,芹菜素可以降低胃癌细胞的存活率。由细胞生存率计算公式得出芹菜素对胃癌细胞系 AGS 的 IC_{50} 为 $34.84\text{ }\mu\text{mol/L}$,

对 MGC-803 的 IC_{50} 为 $24.86\text{ }\mu\text{mol/L}$, MGC-803 细胞的 CCK-8 结果中,与对照组相比 $8\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $16\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度的变化较明显,且与自身的 IC_{50} 值的一半也较接近,浓度太高或太低可能会对细胞影响过大产生误差。因此选择 $8\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $16\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的给药浓度,继续做后续的实验。

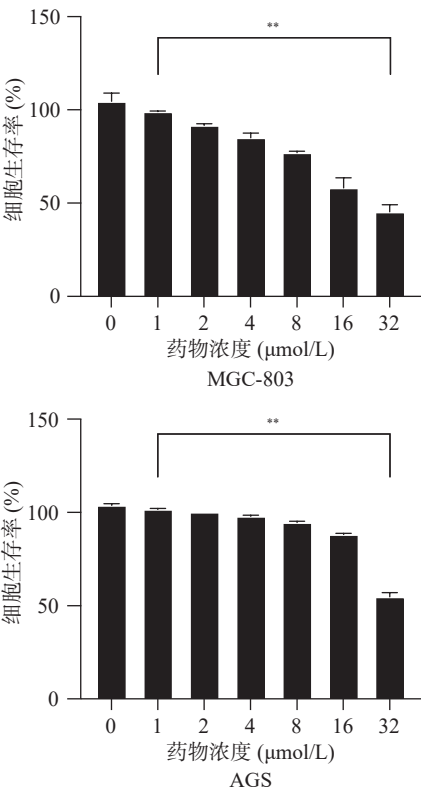


图 6 芹菜素对胃癌细胞 CCK-8 的结果

Fig.6 Results of apigenin on gastric cancer cell CCK-8

注: 与对照组相比, **表示 $P<0.01$, 差异极显著。

2.5.2 芹菜素对胃癌细胞愈合作用的影响 细胞划痕实验是通过在细胞单层上划痕并通过延时显微镜定期捕获图像,从而研究细胞迁移运动、修复能力和细胞间相互作用的实验室技术^[24]。划痕实验结果如图 7、图 9 所示,愈合结果柱状图如图 8、图 10 所示。与对照组相比较,不同给药组的细胞划痕愈合率呈浓度依赖性,浓度越高,愈合率越低。通过该实验推测芹菜素可能通过干扰胃癌细胞的迁移和增殖相关机制,发挥其抑制愈合的效果。可能的作用机制包括调节细胞内的信号通路,如抑制与细胞增殖和迁移密切相关的 $PI3K/Akt/mTOR$ 通路^[25];或者诱导细胞

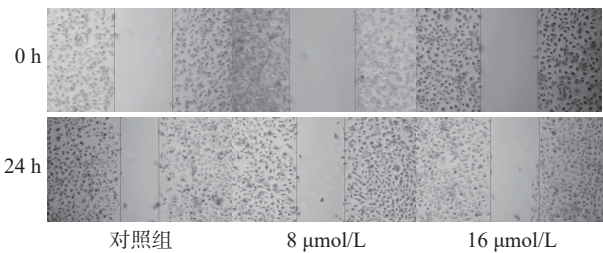


图 7 MGC-803 细胞愈合实验结果

Fig.7 Results of MGC-803 cell healing experiment

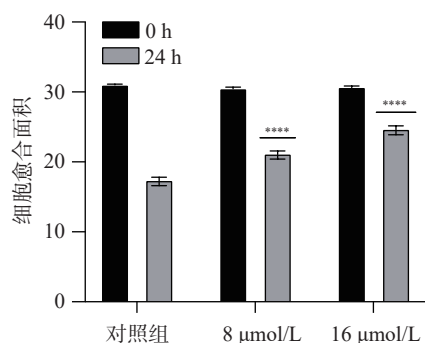


图 8 MGC-803 细胞愈合面积

Fig.8 Histogram of MGC-803 cell healing

注: 与对照组相比, ****表示 $P<0.0001$, 差异高度显著; 图 10 同。

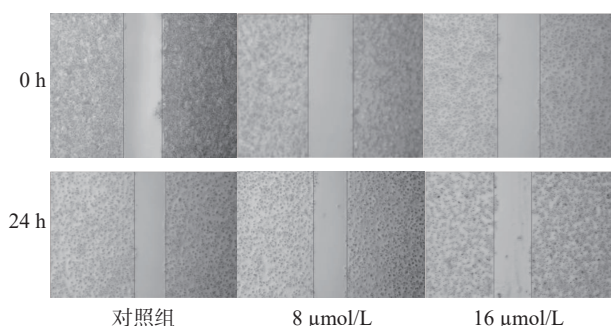


图 9 AGS 细胞愈合实验结果

Fig.9 Results of AGS cell healing experiment

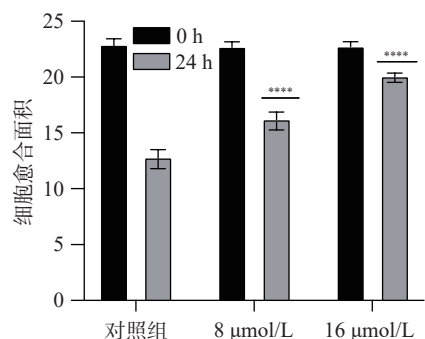


图 10 AGS 细胞愈合面积

Fig.10 Histogram of AGS cell healing

凋亡, 减少具有愈合能力的细胞数量。也有研究发现芹菜素可通过激活线粒体信号转导通路诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡^[26], 并且可抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖来诱导细胞凋亡^[15]。

2.5.3 芹菜素对胃癌细胞侵袭的影响 细胞体外侵袭实验主要应用于肿瘤细胞侵袭和转移能力研究, 该实验经常使用 Transwell plate 通过穿膜侵袭实验来检测肿瘤细胞的侵袭潜能^[27]。图 11 所示, 对照组及 8、16 μmol/L 芹菜素分别处理两种胃癌细胞 24 h 后, 细胞侵袭数量发生明显变化。MGC-803 对照组细胞侵袭数量 832 个, 8 μmol/L 芹菜素组 389 个, 16 μmol/L 芹菜素组减少至 82 个; AGS 对照组细胞侵袭数量 632 个, 8 μmol/L 芹菜素组 276 个, 16 μmol/L 芹菜素组 65 个。上述结果表明芹菜素处

理对胃癌细胞的侵袭能力产生明显影响, 并存在一定的浓度依赖性。

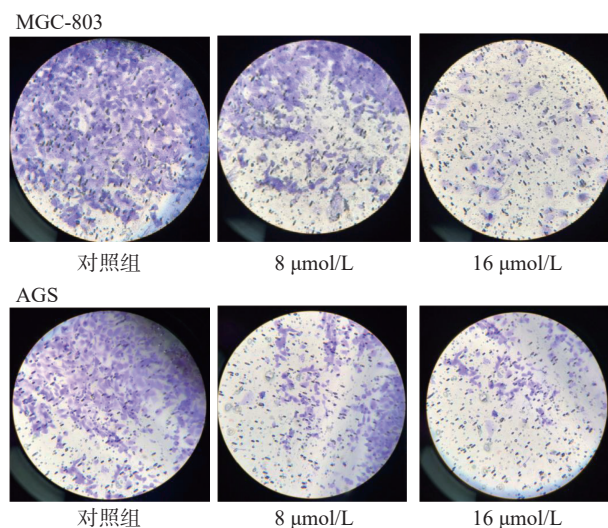


图 11 MGC-803、AGS 细胞侵袭实验结果(200×)

Fig.11 Results of MGC-803, AGS cell invasion experiment (200×)

2.5.4 细胞克隆形成实验 当单个细胞在体外增殖六代以上, 其后代所组成的细胞群体, 成为集落或群体^[28]。实验结果如图 12 所示, 与对照组相比, 可以看到不同浓度的芹菜素组中的克隆细胞数明显减少直至几乎无, 并且每个克隆细胞群的体积也随着芹菜素的浓度增加而减少。

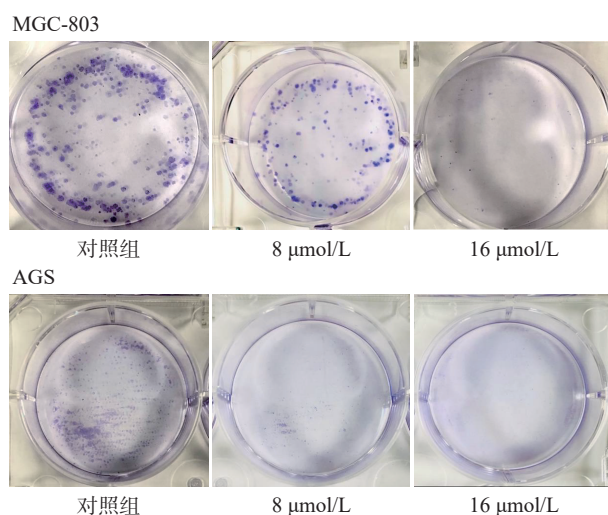


图 12 细胞克隆结果

Fig.12 Results of cell cloning

2.5.5 RT-qPCR 结果 为了进一步验证芹菜素对关键基因的调控作用, 采用 RT-qPCR 分析人胃癌细胞系 MGC-803 和 AGS 细胞系中 MAOA、DPP4、CA2、AChE 的 mRNA 表达水平。RT-qPCR 结果如图 13~图 14 所示, 与对照组相比, 使用芹菜素处理后, 基因 CA2 的表达水平显著上调 ($P<0.01$)。基因 MAOA、DPP4、AChE 表达水平受到显著抑制, 表达降低 ($P<0.01$)。MAOA(单胺氧化酶 A)可通过氧化脱氨

作用降解胺类神经递质^[29], DPP4(二肽基肽酶 4)是广泛表达的跨膜糖蛋白^[30],可作为潜在的泛癌生物标志物^[31]。AChE(乙酰胆碱酯酶)也在生物神经传导中起着关键性的作用^[32]。AChE 是一种分泌型羧酸酯酶,能够降解神经递质乙酰胆碱成为胆碱和乙酸^[33]。AChE 可以使干细胞分化^[34]、突触发生^[35]、促进细胞生长、在细胞凋亡的过程中起着重要作用^[36]。CA(碳酸酐酶)是含有可催化二氧化碳可逆水合作用的含锌金属酶^[37]。推测芹菜素可能是通过促进 CA2 的表达水平,抑制 MAOA、DPP4、AChE 的表达水平来达到治疗胃癌的作用,且以上四个靶点参与免疫调节,通过物质代谢、炎症反应等相关通路调控肿瘤的发生发展。

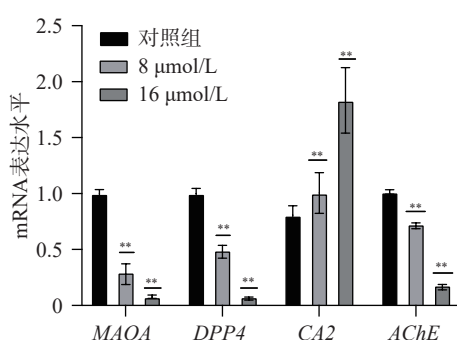


图 13 MGC-803 RT-qPCR 结果

Fig.13 Results of MGC-803 RT-qPCR

注:与对照组相比,**表示 $P<0.01$,差异显著;图 14 同。

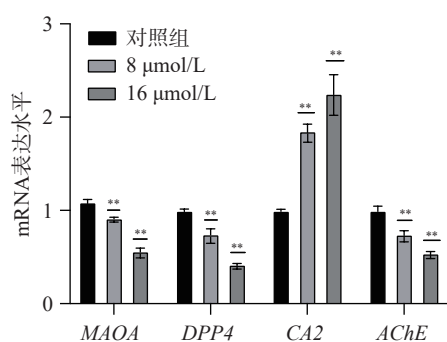


图 14 AGS RT-qPCR 结果

Fig.14 Results of AGS RT-qPCR

3 结论

本文采用网络药理学筛选出芹菜素共 61 个有效靶点,与胃癌交叉靶点有 52 个。芹菜素靶点与抗胃癌靶点 PPI 网络分析为深入研究芹菜素对胃癌细胞的作用机制提供了重要线索,也为开发新的抗胃癌治疗策略提供了潜在的方向;GO 富集分析说明芹菜素抗胃癌的作用与生物学方面有关;KEGG 通路分析表明抗癌机制与神经递质、胆碱能、物质代谢和癌症的发展相关。而芹菜素具体是通过哪一类信号通路抑制胃癌还需进一步的深入研究。

本文通过网络药理学筛选、分子对接技术,预测了芹菜素治疗胃癌的可能靶点。通过神经递质、胆碱能、物质代谢等相关通路来抗胃癌,体外细胞实验

验证了芹菜素能够有效地抑制胃癌细胞 MGC-803 和 AGS 的增殖、迁移、形成群落能力与侵袭,后续可在本研究的基础上,增加动物实验进行验证,进一步明确芹菜素抗胃癌的作用机制。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 刘德华. 胃癌发生发展相关胃肠道菌群以及 SFRPs 基因的生物信息研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2022. [LIU Dehua, Bioinformatics research on the gastrointestinal microbiota and SFRPs genes related to the occurrence and development of gastric cancer[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2022.]
- [2] MUHAMMAD I, TANWEER A G, MUHAMMAD A, et al. Apigenin as an anticancer agent[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(8): 1812–1828.
- [3] 计荣盛, 王梓灵, 吴婷, 等. 芹菜素与氧化苦参碱联合用药抑制非小细胞肺癌的作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(3): 752–761. [JI Rongsheng, WANG Ziling, WU Ting, et al. Effect of apigenin in combination with oxymatrine on non-small cell lung cancer and mechanism[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2023, 48(3): 752–761.]
- [4] FARIEHA H, NAZISH J, KHALIL UR-R, et al. Identification of hypotensive biofunctional compounds of *Coriandrum sativum* and evaluation of their angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition potential[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018:4643736.
- [5] SARA P, MARIKA P, ANTONELLA R, et al. Chemical composition and antioxidant activity of thyme, hemp and coriander extracts: A comparison study of maceration, soxhlet, UAE and RSLDE techniques[J]. *Foods*, 2020, 9(9): 9091221.
- [6] 杨文志, 杜跃中, 高宇, 等. 蒲公英总黄酮的研究进展[J]. 人参研究, 2017, 15(1): 52–55. [YANG Wenzhi, DU Yuezhong, GAO Yu, et al. The research progress of dandelion flavonoids[J]. *Ginseng Research*, 2017, 15(1): 52–55.]
- [7] 冷新, 倪健, 游龙泰, 等. HPLC 法测定德国洋甘菊中槲皮素、木犀草素及芹菜素含量[J]. 国际中医中药杂志, 2018, 40(7): 649–652. [LENG Xin, NI Jian, YOU Longtai, et al. Determination of quercetin, luteolin and apigenin in German chamomile by HPLC[J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 40(7): 649–652.]
- [8] 陈红影, 苗培培, 郭嫦娥, 等. 芫花主要黄酮成分对肝微粒体 UGTs 及 UGT1A1 活性的体外抑制作用[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(3): 305–310. [CHEN Hongying, MIAO Peipei, GUO Change, et al. *In vitro* inhibitory effect of main flavonoids ingredients of genkwa flos on liver microsomal UGTs and UGT1A1 activities[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2017, 34(3): 305–310.]
- [9] GEETHI P, D NEDRA K, VIDURANGA Y W. Antidiabetic properties, bioactive constituents, and other therapeutic effects of *Scoparia dulcis*[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016(8): 8243215.
- [10] ZENG Y Z, TIAN G, YAN H, et al. Apigenin ameliorates hypertension-induced cardiac hypertrophy and down-regulates cardiac hypoxia inducible factor-1α in rats[J]. *Food Funct*, 2016, 7(4): 1992–1998.

- [11] PENGFEI C, XIANHAO H, WENQING L, et al. Apigenin exhibits anti-inflammatory effects in LPS-stimulated BV2 microglia through activating GSK3 β /Nrf2 signaling pathway[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(1): 9–16.
- [12] PIYUSH K, DEEP S, MAMTA T, et al. Functionality of apigenin as a potent antioxidant with emphasis on bioavailability, metabolism, action mechanism and *in vitro* and *in vivo* studies: A review[J]. *Food Biochem*, 2022, 46(4): e13950.
- [13] GITIRANA DE SANTANA J D, SANTOS-MAYORGA O A, FLORENCIO J R, et al. *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl), a natural source of bioactive compounds with antibiotic effect against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12(3): 622.
- [14] 林沈国, 毛怡雯, 赵亚新. 芹菜素抗乳腺癌作用及机制的研究进展[J]. *浙江医学*, 2023, 45(2): 213–219. [LIN Shenguo, MAO Yiwen, ZHAO Yaxin. Research progress of apigenin anti-breast cancer effect and mechanism[J]. *Zhejiang Medical Journal*, 2023, 45(2): 213–219.]
- [15] 崔昭阳, 李素娜, 姜旭倩, 等. 芹菜素激活 TRAIL 死亡受体参与诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的实验研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 2021, 33(1): 32–36. [CUI Zhaoyang, LI Suna, JIANG Xuqian, et al. Activation of the TRAIL death receptor by apigenin for induction of apoptosis in the gastric cancer SGC-7901 cells[J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2021, 33(1): 32–36.]
- [16] 崔迎红, 陈阿, 许畅, 等. 芹菜素上调 SHP-1 蛋白表达抑制肝癌 MHCC97H 细胞 STAT3 磷酸化及球形成[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2018, 15(5): 1–4. [CUI Yinghong, CHEN E, XU Chang, et al. Inhibition of spheroid formation and STAT3 phosphorylation through up-regulating expression of SHP-1 by apigenin in human liver cancer MHCC97H cells[J]. *Journal of Hunan Normal University (Medical science)*, 2018, 15(5): 1–4.]
- [17] 谢孟君. 基于网络药理学和代谢组学技术对补肾活血方防治 DR 的作用机制及配伍机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021. [XIE Mengjun. Study on the action mechanism and compatibility mechanism of bushen huoxue prescription in the prevention and treatment of DR based on network pharmacology and metabolomics[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2021.]
- [18] ZHAO L, ZHANG H, LI N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309(12): 116306.
- [19] 金其煌. 乙酰胆碱酯酶在细胞凋亡中的作用及 G418 诱导细胞凋亡的分子机制[D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2004. [JIN Qihuang. The role of acetylcholinesterase in apoptosis[D]. Shanghai: Shanghai Institutes for Biological Sciences, 2004.]
- [20] 王飞龙. 神经系统在癌症中的功能研究及生物标志物识别[D]. 长春: 吉林大学, 2022. [WANG Feilong. Function research and biomarker identification of nervous system in cancer[D]. Changchun: Jilin University, 2022.]
- [21] 周辉. 神经相关因子在结直肠癌患者中的表达及迷走神经对免疫微环境的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021. [ZHOU Hui. Expression of neurotransmitters in colorectal cancer and effect of vagus nerve on immune microenvironment[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2021.]
- [22] 黄杰波, 贾海英, 张涛. CAII 与恶性肿瘤的相关研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(43): 128–130. [HUANG Jiebo, JIA Haiying, ZHANG Tao. Correlation between CAII and malignant tumors[J]. *World Latest Medicine Information*, 2019, 19(43): 128–130.]
- [23] 金雅晴. 基于网络药理学的抗流感病毒药物研究[D]. 北京: 军事科学院, 2022. [JIN Yaqing. Network-based pharmacology of anti-influenza virus drugs: The case of moslae herba[D]. Beijing: Military science, 2022.]
- [24] 关玮, 杨树国, 李健, 等. CCK-8 法在阴道毛滴虫体外增殖检测中的应用研究[J]. *湖北医药学院学报*, 2021, 40(6): 591–596. [GUAN Wei, YANG Shuguo, LI Jian, et al. The application of CCK-8 method in the detection of trichomonas proliferation *in vitro*[J]. *Journal of Hubei University of Medicine*, 2021, 40(6): 591–596.]
- [25] 孙悦, 余洋, 吴坤. 芹菜素诱导胃癌 SGC-7901 细胞自噬及其对凋亡的影响[J]. *癌变·畸变·突变*, 2017, 29(4): 289–294, 299. [SUN Yue, YU Yang, WU Kun. Effect of apigenin-induced autophagy on apoptosis in human gastric cancer cells SGC-7901[J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2017, 29(4): 289–294, 299.]
- [26] 黄暨生. 木犀草素、芹菜素及槲皮素对黑色素瘤自杀基因治疗的增效研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016. [HUANG Jisheng. Study on synergism of luteolin, apigenin and quercetin on suicide gene therapy of melanoma[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.]
- [27] DENNIS K, WOLFGANG W, ULRIKE S S. Real-time cell migration monitoring to analyze drug synergism in the scratch assay using the incucyte system[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2294(3): 133–142.
- [28] 蒋海鹰, 颜亚晖, 罗庚求, 等. 细胞体外侵袭实验中 Transwell plate 染色技术改良[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2011, 96(6): 644–645. [JIANG Haiying, YAN Yahui, LUO Gengqiu, et al. Improved Transwell plate staining technique in cell invasion *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2011, 96(6): 644–645.]
- [29] 刘震. SHP2 抑制剂 Batoprostafib 治疗耐药胃肠间质瘤 (GIST) 的机制研究及 GIST 综合治疗分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2023. [LIU Zhen. SHP2 allosteric inhibitor Batoprostafib inhibits proliferation of imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor (GIST) and the comprehensive analyses of treatment strategies for GIST[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2023.]
- [30] 黄炳御, 唐旭东. MAOA 与肿瘤关系的研究进展[J]. *生命科学*, 2018, 30(5): 545–550. [HUANG Bingyu, TANG Xudong. Progress in the relationship between MAOA and tumor[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, 30(5): 545–550.]
- [31] 谢云亮, 赵云娟, 李万根. 二肽基肽酶 4 相关信号通路研究新进展[J]. *广东医学*, 2018, 39(12): 1901–1905. [XIE Yunliang, ZHAO Yunjuan, LI Wangen. New advances in the study of dipeptidyl peptidase 4 related signaling pathways[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2018, 39(12): 1901–1905.]
- [32] 陈静, 张尚暖. 铁死亡相关基因 DPP4 与肿瘤免疫及预后的生物信息学研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(11): 2348–2354, 2360. [CHEN Jing, ZHANG Shangnan. Bioinformatics study on ferroptosis related gene DPP4 in tumor immunity and prognosis[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2023, 39(11): 2348–2354, 2360.]
- [33] 胡太平, 曹建国. 芹菜素诱导人胃癌细胞凋亡作用及机制研究[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2007, 27(1): 6–10, 93. [HU Taiping, CAO Jianguo. Study on pro-apoptotic effect of apigenin on

human gastric cancer cells and its underlying mechanisms[J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2007, 27(1): 6–10,93.]

[34] 肖静. 乙酰胆碱酯酶在癌症基因—病毒靶向治疗系统中的抗癌作用[D]. 新乡: 河南师范大学, 2014. [XIAO Jing. The anti-tumor effect of acetyl cholinesterase in cancer gene-viro targeting therapy system[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2014.]

[35] 张中惠. 神经干细胞调控过程中相关神经分子的定量分析[D]. 上海: 华东师范大学, 2022. [ZHANG Zhonghui. Quantitative analysis of ralated neuralmolecules in the regulation of neural

stem cells[D]. Shanghai: East China Normal University, 2022.]

[36] 安楠. 运动对成长期大鼠神经肌肉接头发育的影响及机制研究[D]. 北京: 北京体育大学, 2009. [AN Nan. Effects and mechanism of activities on neuromuscular junction development in young rats[D]. Beijing: Beijing Sport University, 2009.]

[37] 徐恩斌, 张忠兵, 谢渭芬. 乙酰胆碱酯酶的研究进展[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 2003, 23(1): 73–75. [XU Enbin, ZHANG Zhongbing, XIE Weifen. Research progress of acetylcholinesterase[J]. Foreign Medical Sciences (Section of Pathophysiology and Clinical Medicine), 2003, 23(1): 73–75.]