

基于网络药理学及实验验证探讨胃宁颗粒治疗胃癌的物质基础及作用机制

赵桂玉^{1*}, 秦艺文¹, 戴文娟¹, 陈广玲¹, 吴黎川¹, 韦金锐^{2#}

¹广西大学医学院, 广西 南宁

²广西中医药大学, 广西中医药科学实验中心, 广西 南宁

收稿日期: 2024年2月9日; 录用日期: 2024年3月8日; 发布日期: 2024年3月15日

摘要

目的探究胃宁颗粒治疗胃癌的物质基础及作用机制。方法利用CCK-8及transwell实验检测胃宁颗粒对胃癌细胞增殖及迁移的影响; 通过液相色谱-质谱联用及蛋白质组技术分别获得胃宁颗粒活性成分及差异表达蛋白; 通过网络药理学及Cytoscape 3.9.1软件构建胃宁颗粒活性成分-靶点-胃癌网络; 利用GO/KEGG开展富集分析; 利用分子对接阐明关键核心靶点与活性成分的相互作用。结果共筛选出胃宁颗粒治疗胃癌有效成分23个, 作用靶点19个; PI3K-Akt及凋亡通路可能是胃宁颗粒治疗胃癌的主要作用通路; VEGFA、BCL2L1及CDK4可能是胃宁颗粒治疗胃癌的关键靶点。结论刺芒柄花素、槲皮素、莪术二酮可能是胃宁颗粒治疗胃癌的物质基础, 与调控VEGFA、BCL2L1及CDK4信号通路有关。

关键词

胃宁颗粒, 胃癌, 网络药理学, 分子对接, 作用机制

Exploring the Material Basis and Mechanism of Weining Granules against Gastric Cancer Based on Network Pharmacology and Experiment Validation

Guiyu Zhao^{1*}, Yiwen Qin¹, Wenjuan Dai¹, Guangling Chen¹, Lichuan Wu¹, Jinrui Wei^{2#}

¹School of Medicine, Guangxi University, Nanning Guangxi

²Guangxi Scientific Research Center of Traditional Chinese Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 赵桂玉, 秦艺文, 戴文娟, 陈广玲, 吴黎川, 韦金锐. 基于网络药理学及实验验证探讨胃宁颗粒治疗胃癌的物质基础及作用机制[J]. 药物资讯, 2024, 13(2): 56-67. DOI: 10.12677/pi.2024.132008

Abstract

Objective to explore the material basis and mechanism of Weining Granules in the treatment of gastric cancer. Methods cell viability and migration were detected via CCK-8 and transwell assays. The active compounds and differentially expressed proteins of WNG were obtained by liquid chromatography-mass spectrometry and proteomics techniques, respectively. The active ingredient-target-gastric cancer network was constructed by using Cytoscape 3.9.1 software. GO/KEGG Enrichment analysis was performed to predict the signaling pathway. Key core targets were revealed through PPI (Protein protein interaction). The interactions between key core targets and active ingredients were explored by molecular docking. Results A total of 23 effective compounds and 19 targets of WNG were identified against gastric cancer. KEGG pathway analysis found that PI3K-Akt and apoptosis pathway may be the main therapeutic pathways of WNG against gastric cancer. The PPI action network and bioinformatics analysis reveal that VEGFA, BCL2L1, and CDK4 are key therapeutic targets for gastric cancer. Conclusion formononetin, quercetin, and curdione may be the main material basis of WNG in the treatment of gastric cancer, which is related to the regulation of VEGFA, BCL2L1, and CDK4 signaling pathways.

Keywords

Weining Granules, Gastric Cancer, Network Pharmacology, Molecular Docking, Mechanism

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胃癌是常见的癌症之一。世界卫生组织数据显示, 2020 年全球新发胃癌病例 108.9 万例, 占全球新发癌症病例的 5.6%; 死亡病例 76.9 万例, 占死亡病例的 7.7%。中国胃癌病例 47.8 万例, 死亡 37.4 万例, 分别占全球胃癌病例和死亡人数的 43.94% 和 48.62% [1]。虽然 2004~2020 年中国胃癌标化死亡率呈下降趋势, 但由于老龄化趋势严峻, 胃癌在中国的发病率、致死率仍然较高[2]。癌症的早发现、早诊断、早治疗是降低死亡风险和延长生存期的主要策略, 但胃癌早期病例仅占 10%~20% [3], 大部分患者确诊时处于中晚期, 整体预后较差。胃癌早期多无明显特殊症状, 起病较隐匿, 临床上通常采用保守的全身综合治疗方法, 如放疗、化疗、靶向药物治疗以及生物免疫治疗。然而, 放化疗副作用较大, 靶向药物及免疫治疗适应症有限、费用昂贵[4] [5] [6]。因此, 急需开发新的胃癌治疗药物。

中医药作为我国国粹, 因其具有“高效、低毒、多靶点、低成本”等优势, 被广泛应用于各种肿瘤的治疗[7], 如槐耳颗粒[8]、斑蝥胶囊[9]等。中医药通过抑制细胞增殖、细胞侵袭与转移、血管生成, 诱导细胞凋亡及自噬, 提升肿瘤患者的免疫力及增敏化疗药物的敏感性而发挥临床抗癌疗效[10]。大量的临床资料表明, 化疗配合中药及其有效活性成分治疗肿瘤比单纯化疗具有更好的疗效和更低的不良反应[11] [12] [13]。胃宁颗粒(Weining Granules, WNG)作为中药复方制剂, 主要由黄芪、莪术、茯苓、枸杞等药材组成。临床数据表明胃宁颗粒在胃癌治疗中表现突出, 在改善胃癌患者临床症状、延长生存期、以及减轻化疗后不良反应等方面, 具有确切的临床疗效[14], 然而其治疗胃癌的物质基础及作用机制仍未完全阐明。

网络药理学的概念由英国安德鲁·霍普金斯教授于 2007 年首次提出[15]。该方法结合药理学、分子生物学、医学、生物信息学以及统计学探讨药物对疾病的作用机制[16]。网络药理学因其多靶点、多通路、可视化等特点已被广泛地应用于预测药物成分及探讨疾病的潜在作用机制[17]。例如,李媛媛等人运用网络药理学并结合实验验证探讨了江南卷柏治疗喉癌的作用机理[18]。Fan 等通过网络药理学解析了左金胶囊抑制结肠癌的作用机制[19]。本研究基于网络药理学、蛋白互作分析、富集分析、差异表达分析、生存分析等生物信息学方法,并结合液相色谱-质谱联用及蛋白质组技术揭示胃宁颗粒治疗胃癌的有效成分及作用机制,绘制“胃宁颗粒-成分-靶点-通路-胃癌”互作网络图,进一步通过分子对接揭示胃宁颗粒有效成分对靶点的作用。

2. 方法

2.1. 胃宁颗粒主要活性成分的筛选及靶点预测

本课题组前期通过色谱-质谱联用技术获得胃宁颗粒主要活性成分 23 个[20] (表 1)。随后,将得到的活性成分名称输入 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行检索,获得该化合物的 2D 结构,将 2D 结构或 SMILES 结构式导入 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),以置信度 probability > 0 为筛选阈值预测化合物潜在靶点。

2.2. 胃宁颗粒调控的差异表达蛋白

本论文使用的胃癌细胞 SGC-7901 购自于中国科学院细胞库,并培养在含 10% 胎牛血清及 100 U/ml 的青霉素及链霉素的 DMEM 培养基中。使用浓度为 0.1 g/ml 的胃宁颗粒处理 SGC-7901 细胞 48 小时,获取细胞总蛋白后采用 TMT 标记定量蛋白质组学揭示胃宁颗粒导致的蛋白表达谱变化。随后,以表达倍数|Fold Change| ≥ 1.2, P < 0.05 为筛选标准获得胃宁颗粒调控的差异表达蛋白。

2.3. 交集靶点的确定和富集分析

首先,将化合物预测靶点和差异表达蛋白导入 Venny 2.1.0 (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)绘制韦恩图,筛选出交集靶点蛋白。其次,将交集靶点蛋白导入 Metascape 平台(<https://metascape.org/gp/index.html>),以 P < 0.01 为筛选标准,分别进行 GO (gene ontology)生物功能分析和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路富集分析,其中 GO 功能分析包括生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)及细胞组成(cellular component, CC),将获得的数据结果应用于微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>)绘制 GO 功能分析柱状图和 KEGG 通路富集分析条形图。

2.4. “胃宁颗粒-成分-靶点-通路-胃癌”网络的构建及核心成分的筛选

将收集并归类好的主要活性成分、交集靶点和信号通路导入至 Cytoscape 3.9.1 中,构建“胃宁颗粒-成分-靶点-通路-胃癌”网络,再利用 CytoHubba 插件工具对成分节点进行拓扑分析,计算出相关参数,以介数中心性(Betweenness Centrality)、接近中心性(Closeness Centrality)、度值(Degree)三类参数同时大于平均值为标准筛选核心成分。

2.5. 核心靶点的筛选

将交集靶点蛋白输入 String (<http://string-db.org/>)数据库,将物种设置为人(Homo sapiens),置信度设置为“0.4”。取蛋白间的相互作用信息,构建蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络图,导出图片为 TSV 格式并导入 Cytoscape 3.9.1 软件,利用 cytoHubba 插件工具对其进行拓扑参数分析,选择介数中心性、接近中心性、度值三类参数同时大于平均值的靶点作为核心靶点。

2.6. 核心靶点的差异分析、生存分析及受试者操作特征曲线(ROC)分析

从 TCGA 数据库中下载并整理 TPM 格式的胃腺癌 RNAseq 数据及胃癌病人临床信息。去重复后,使用 R (4.2.1)的“stats”包进行差异统计分析,并使用“ggplot2”包对结果进行可视化。使用 R (4.2.1)的“survminer”包进行生成分析。通过运行 R (4.2.1)的“pROC”开展 ROC 分析。

2.7. 分子对接

首先从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中获取核心靶点的分子结构,利用 Pymol 软件对结构去水、去配体后保存数据;从 Pubchem 数据库中获取核心成分的 3D 结构,利用 Open Babel 3.1.1 软件将 SDF 格式转化为 mol2 格式。将准备好的靶点蛋白与化合物结构导入 Auto Dock Tools 1.5.7 中进行加氢、设置扭转键等操作最后转化为 PDBQT 的格式保存,将受体和配体的 PDBQT 文件导入 Auto Dock Tools 1.5.7 进行分子对接。取分子对接结合能最低的结合模型导入 Pymol 中进行可视化。

2.8. 细胞增殖及 Transwell 实验

取对数生长期的 SGC-7901 细胞按 5000/孔种植于 96 孔板,24 小时后加入不同浓度 WNG 处理 48 小时。随后每孔加入 10 微升 CCK-8 溶液,继续培养 2 小时后测量 450 nm 处吸光值。Transwell 小室(ECM550, Chemicon, USA)事先用无血清培养基水化至少 1 小时。将不同处理细胞(5×10^4 个细胞)接种到每个小室(上室)中。将含有 10% FBS 的 DMEM 培养基加载到底部室中。24 小时后,取出插入膜上表面的细胞,同时用甲醇固定下表面的细胞、用结晶紫染色并通过显微镜计数。

3. 结果

3.1. 胃宁颗粒(WNG)剂量依赖性抑制胃癌细胞增殖及迁移

为了检测胃宁颗粒对胃癌细胞增殖及迁移的影响,我们开展了 CCK-8 及 transwell 实验。结果显示,胃宁颗粒剂量依赖性地抑制胃癌细胞增殖(图 1(A))。Transwell 结果提示胃宁颗粒显著抑制胃癌细胞的迁移(图 1(B))。

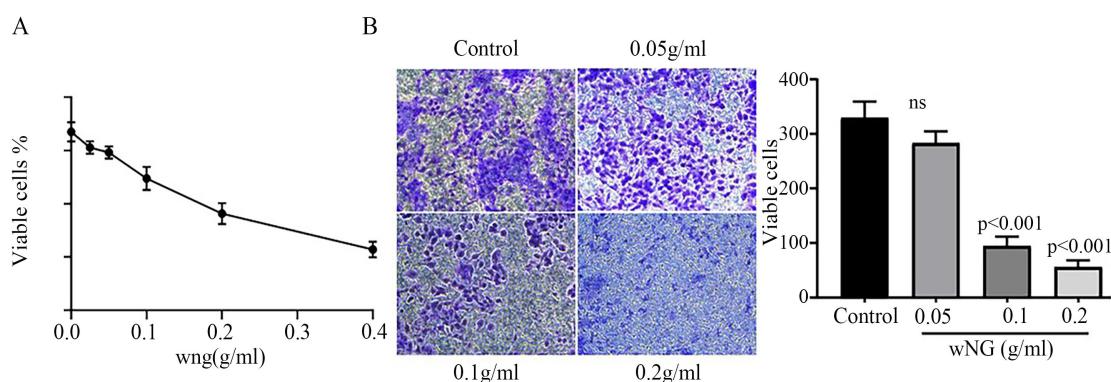


Figure 1. WNG inhibited the proliferation and migration of gastric cancer cells in a dose-dependent manner. (A) Proliferation curve of SGC7901; (B) represent images of cell migration and statistics

图 1. 胃宁颗粒剂量依赖性抑制胃癌细胞增殖与迁移。(A) 细胞增殖曲线图; (B) 细胞迁移结果及统计

3.2. 药物成分的初步筛选和成分靶点的获取

借助色谱-质谱联用技术,通过比对目标化合物与数据库中化合物的片段模式,利用 SCIEX OSV1.4

软件我们从胃宁颗粒中共鉴定出 23 个主要活性成分, 将活性成分导入 Swiss Target Prediction 数据库中进行靶点预测, 以置信度 $\text{probability} > 0$ 为阈值筛选得到 437 个成分相关靶点, 其中甜菜碱(Betaine)不符合阈值条件的相关靶点, 故胃宁颗粒中实含 22 个有效成分。

Table 1. The main active compounds in WNG

表 1. 胃宁颗粒中的主要活性成分

编号	化合物	分子式	相对分子质量
1	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	192.12
2	甜菜碱	$C_5H_{11}NO_2$	117.15
3	毛蕊异黄酮	$C_{16}H_{12}O_5$	284.26
4	毛蕊异黄酮苷	$C_{22}H_{22}O_{10}$	446.40
5	薯蓣皂 c 素	$C_{27}H_{42}O_3$	414.62
6	刺芒柄花	$C_{16}H_{12}O_4$	268.27
7	莪术醇	$C_{15}H_{22}O_2$	234.33
8	茯苓酸 B	$C_{30}H_{44}O_5$	484.68
9	芒柄花苷	$C_{22}H_{22}O_9$	430.41
10	莪术二酮	$C_{15}H_{24}O_2$	236.35
11	腺苷	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.24
12	黄芪皂苷 I	$C_{45}H_{72}O_{16}$	869.04
13	秦皮甲	$C_{15}H_{16}O_9$	340.28
14	黄芪异黄烷苷	$C_{23}H_{28}O_{10}$	464.47
15	松脂素单甲基醚-D-葡萄糖苷 (松脂醇-4-O-BETA-D-吡喃葡萄糖苷)	$C_{26}H_{32}O_{11}$	520.53
16	双羟香豆	$C_{19}H_{12}O_6$	336.29
17	黄芪皂苷 II	$C_{43}H_{70}O_{15}$	827.01
18	羟基番茄胺	$C_{27}H_{45}NO_3$	431.65
19	重楼皂苷 VII	$C_{51}H_{84}O_{22}$	1049.20
20	薯蓣皂苷	$C_{45}H_{72}O_{16}$	869.04
21	黄芪甲苷	$C_{41}H_{68}O_{14}$	784.97
22	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	302.24
23	重楼皂苷 VI	$C_{39}H_{62}O_{13}$	738.90

3.3. 胃宁颗粒处理下胃癌细胞 SGC-7901 蛋白表达谱变化

根据本课题组前期研究[20], 以 $|\text{Fold Change}| > 1.2$, $P < 0.05$ 为标准, 获得 619 个胃宁颗粒处理下胃癌细胞差异表达蛋白(图 2)。

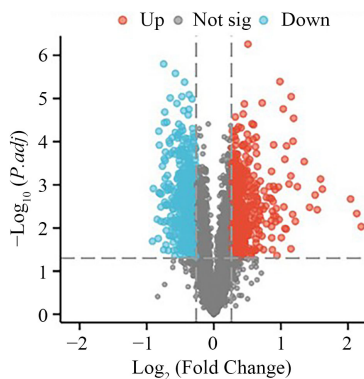


Figure 2. Volcano plot of differentially expressed proteins induced by WNG
图 2. 胃宁颗粒诱导的胃癌差异表达蛋白火山图

3.4. 交集靶点的确定及 GO/KEGG 分析

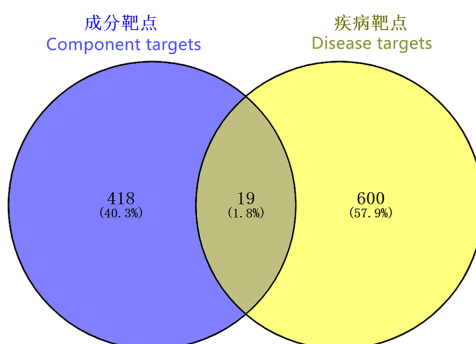


Figure 3. Venn diagram of drug components and disease intersection targets
图 3. 药物成分与疾病交集靶点的韦恩图

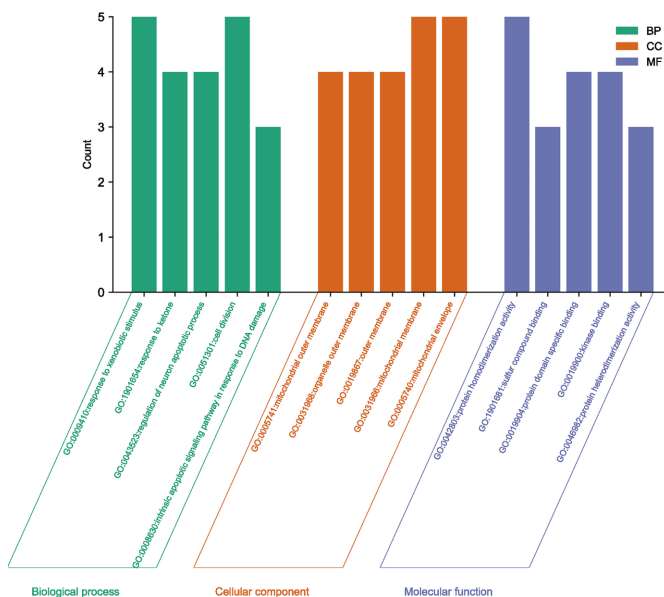


Figure 4. GO enrichment analysis
图 4. GO 富集分析

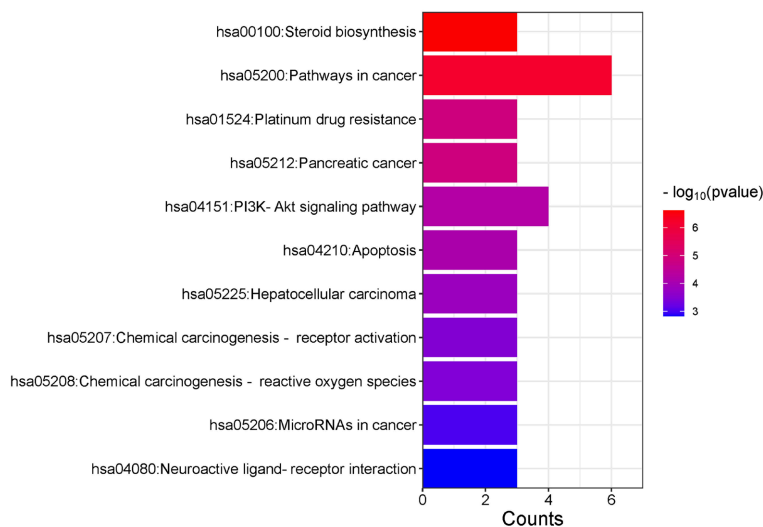


Figure 5. KEGG pathway enrichment analysis
图 5. KEGG 通路富集分析

将预测的成分靶点与差异表达蛋白取交集，共得到 19 个交集靶点(图 3)。将 19 个交集靶点导入 Metascape 数据库中进行 GO 分析和 KEGG 富集分析($P < 0.01$ 且靶点数 ≥ 3)。GO 富集分析结果显示 19 个靶点共富集出生物学过程(BP) 57 条、细胞组分(CC) 13 条、分子生物功能(MF) 9 条。根据 P 值筛选出 BP、CC 和 MF 各前 5 条作柱状图，主要涉及对外源性刺激的反应、神经元凋亡过程的调节、细胞分裂、线粒体膜、线粒体包膜等生物学过程(图 4)。KEGG 通路富集分析获得 11 个信号通路，主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、癌症途径通路、细胞凋亡通路、类固醇生物合成信号通路及化学致癌通路等等(图 5)。

3.5. “胃宁颗粒 - 成分 - 靶点 - 通路 - 胃癌”网络的构建及核心成分的筛选

将 19 个交集靶点、22 个有效成分及富集前 10 的 KEGG 信号通路导入 Cytoscape 3.9.1 中，构建“胃宁颗粒 - 成分 - 靶点 - 通路 - 胃癌”网络(图 6)。图中有 53 个节点，110 条边。利用 cytoHubba 插件工具计算节点拓扑参数，选择介数中心性、接近中心性、度值三类参数同时大于平均值的化学成分作为本次研究的核心成分，即以同时满足 $betweenness > 0.104$, $closeness > 0.218$, $degree > 2.22$ 为阈值筛选出 3 个核心成分，分别是：槲皮素(Quercetin)、莪术二酮(Curdione)、刺芒柄花素(Formononetin)。

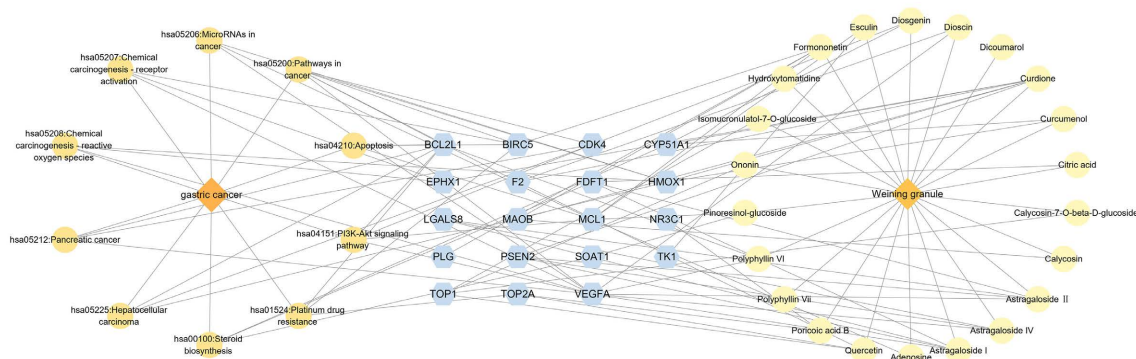


Figure 6. WNG-component-target-pathway-gastric cancer network
图 6. 胃宁颗粒 - 成分 - 靶点 - 通路 - 胃癌网络图

3.7. 核心靶点在胃癌中的表达、预后及 ROC 分析

进一步的, 我们通过生物信息学评估了排名前 3 的核心靶点在胃癌发生中的潜在作用。首先, 通过差异表达分析发现, 与癌旁组织相比, VEGFA、BCL2L1、CDK4 皆显著高表达于胃癌组织(图 8(A)); 其高表达与胃癌患者预后不良显著正相关(图 8(B)); ROC 分析结果提示这三个核心基因是胃癌良好的临床预测指标(图 8(C))。

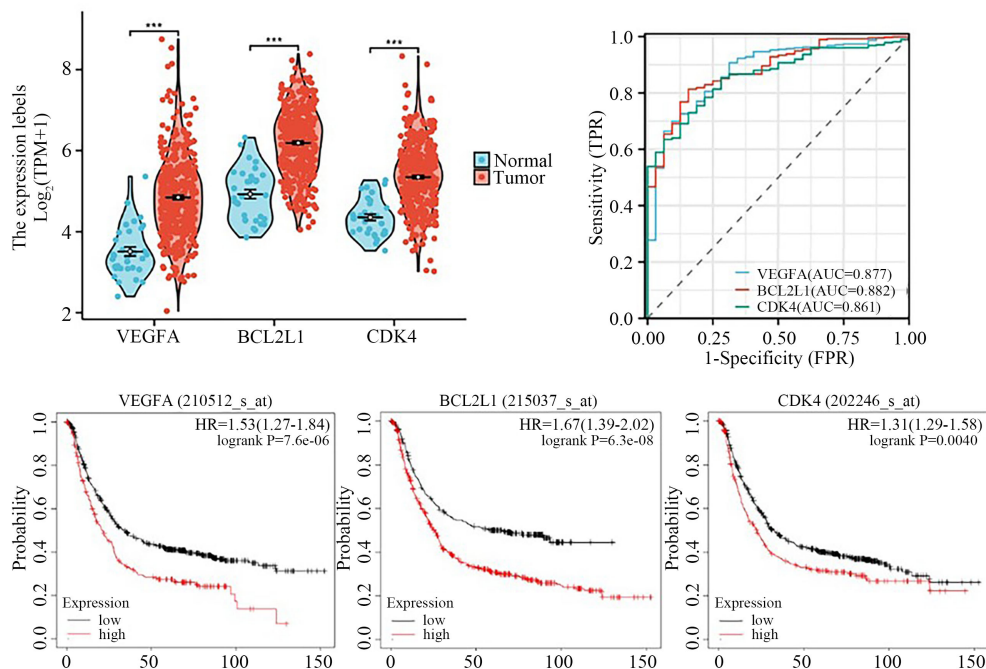


Figure 8. Expression and prognosis of key targets in GC. (A) DEGs analysis; (B) ROC analysis; (C) Prognosis analysis

图 8. 核心基因在胃癌中的表达及预后分析。(A) 差异表达分析; (B) ROC 分析; (C) 预后分析

3.8. 分子对接

将胃宁颗粒核心成分(莪术二酮、刺芒柄花素、槲皮素)与核心靶点(VEGFA、BCL2L1、CDK4)做分子对接。结果显示: VEGFA、BCL2L1、CDK4 分别与莪术二酮、刺芒柄花素、槲皮素对接活性最好(表 3、图 9)。

Table 3. The molecular docking score of core targets and core components

表 3. 核心靶点与核心成分的分子对接分数

核心靶点	核心成分	score
VEGFA	Curdione	-7.43
	Formononetin	-5.53
	Quercetin	-4.84
BCL2L1	Formononetin	-7.74
	Quercetin	-6.11
	Curdione	-5.73
	Curdione	-6.62

续表

CDK4	Quercetin	-6.05
	Formononetin	-5.1

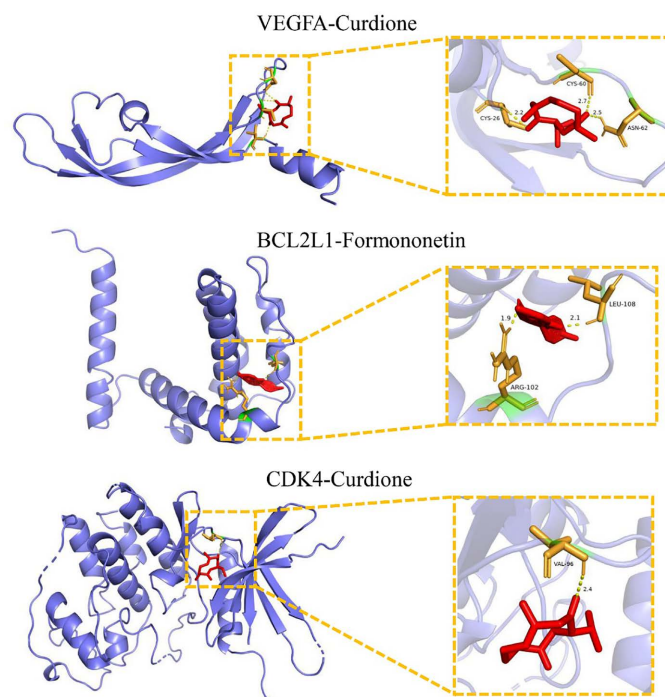


Figure 9. The molecular docking between core targets and compounds
图 9. 核心蛋白与核心成分的分子对接

4. 讨论

胃宁颗粒是全国名老中医蓝青强教授基于多年临床经验研制而成的中药复方，对胃癌有很好的临床治疗效果[14]。相关研究表明，胃宁颗粒能抑制胃癌细胞的增殖，诱导胃癌细胞凋亡[20]。然而，目前胃宁颗粒治疗胃癌的药效基础及作用机制仍未阐明。本研究基于整合生物信息学(网络药理学、分子对接、差异表达分析、预后分析及 ROC 分析)并结合实验(液相色谱-质谱联用及蛋白质组学)系统探讨了胃宁颗粒治疗胃癌的有效活性成分、作用靶点及信号通路。结果显示，胃宁颗粒抗胃癌主要活性成分 23 个，作用于 19 个胃癌相关靶点。作用靶点主要富集在 PI3K-Akt 信号通路、癌症途径通路、细胞凋亡通路、类固醇生物合成信号通路及化学致癌通路等相关通路。分子对接结果提示胃宁颗粒治疗胃癌的核心成分是刺芒柄花素、槲皮素、莪术二酮，核心靶点则为 VEGFA、BCL2L1 及 CDK4。

网络药理学基于其“多成分-多靶点-多通路”的原理被广泛运用于中药复方药效的解析。目前，在大部分网络药理学的相关研究中，科研工作者选取的化合物分子(活性成分)大部分源自文献报道和相关网络数据库，如 TCMSP、TCMID、GeneCards 及 OMIM 等，并未进行真正的实验研究(分离提取及鉴定)。由于提取工艺和药物/植物资源产地不同网络数据库中已报道成分未必在该种药用提取物中存在，这会导致构建的网络及预测的作用机制不够准确。在本研究中，我们通过液相色谱-质谱联用实验确认胃宁颗粒的主要成分，通过蛋白质组学获得胃宁颗粒导致的差异表达蛋白作为作用靶点。相较于传统网络药理学，我们的结果更为真实、可靠。

本研究发现的三个核心靶点 VEGFA、BCL2L1 及 CDK4 在胃癌的发生发展中扮演了至关重要的角色。

血管生成是肿瘤增殖及转移最重要的环节之一,调控血管生成的基因往往是肿瘤治疗的潜在靶点[21]。研究报道显示 VEGFA 可以诱导肿瘤血管生成,从而促进胃癌的生长与转移[22]。目前,已有包括 Ramucirumab [23]、Apatinib [24]在内的多种 VEGFA 靶向治疗胃癌药物。BCL2L1 是 BCL-2 家族的抗凋亡成员,在胃癌组织中高表达,下调 BCL2L1 抑制胃癌细胞增殖[25]。CDK4 参与细胞周期调控,其高表达是胃癌细胞异常增殖的重要原因之一[26]。在本研究中,我们发现三个核心成分莪术二酮(Curdione)、刺芒柄花素(Formononetin)及槲皮素(Quercetin)与以上三个核心靶点有很好的对接活性。已有研究结果表明刺芒柄花素及槲皮素能下调 VEGFA 的表达,抑制血管形成[27] [28]。槲皮素能通过下调 BCL2L1 诱导胃癌细胞凋亡[29]。槲皮素及刺芒柄花素能下调 CDK4 的表达诱导细胞周期阻滞[30] [31]。我们的研究一方面验证了前人已发表的结果,另一方面发现了潜在的蛋白抑制物。

PI3K/Akt 信号通路是各种类型癌症的主要信号通路,通过影响细胞存活、转移和代谢从而调控癌症的发生与发展[32]。例如,PI3K/Akt 的持续活化促进非小细胞肺癌的发生及发展[33]。异常激活的 PI3K/Akt 通路可以诱导 EMT 进而促进胃癌转移[34]。PI3K/Akt 通路的异常活化是肝癌转移的主要因素[35]。TNF- α 可通过上调 PI3K/Akt 信号通路中关键因子,增强口腔鳞癌细胞侵袭转化能力[36]。因此,PI3K/AKT 通路被认为是癌症最重要的靶点之一。

5. 结论

综上所述,本研究基于网络药理学及富集分析发现胃宁颗粒有效成分可能通过抑制 PI3K/AKT 通路活性从而降低胃癌细胞活性及侵袭。PI3K/AKT 通路可能是胃宁颗粒抗胃癌主要作用机制。

基金项目

广西大学大学生创新创业训练计划项目(S202210593280)。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] 郭浩阳, 陈玉娟, 汪伟, 等. 2004-2020 年中国胃癌死亡趋势分析[J]. 长治医学院学报, 2022, 36(6): 418-422.
- [3] 中华医学会肿瘤学分会, 中华医学会杂志社. 中华医学会胃癌临床诊疗指南(2021 版) [J]. 中华医学杂志, 2022, 102(16): 1169-1189.
- [4] 丁彤, 董洪敏, 王文玲, 等. 局部晚期胃癌放疗不同联合方式及放疗转化手术治疗的疗效分析[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(1): 99-103.
- [5] 王舟, 汪文杰, 徐伟, 等. 胃癌靶向治疗及其耐药机制的研究进展[J]. 山东医药, 2024, 64(1): 106-110.
- [6] Geisler, A.N., Phillips, G.S., Barrios, D.M., *et al.* (2020) Immune Checkpoint Inhibitor-Related Dermatologic Adverse Events. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **83**, 1255-1268. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.03.132>
- [7] Liao, X., Bu, Y. and Jia, Q. (2020) Traditional Chinese Medicine as Supportive Care for the Management of Liver Cancer: Past, Present, and Future. *Genes & Diseases*, **7**, 370-379. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.016>
- [8] 王兴东, 雷洁琼, 李正果, 等. 槐耳颗粒治疗原发性肝癌的研究进展[J]. 甘肃医药, 2021, 40(4): 297-298+309.
- [9] 贾清馨, 周巡, 赖华清, 等. 液质联用和网络药理学用于复方斑蝥胶囊治疗原发性肝癌的机制研究[J]. 遵义医科大学学报, 2022, 45(5):613-623.
- [10] Li, K., Xiao, K., Zhu, S., *et al.* (2022) Chinese Herbal Medicine for Primary Liver Cancer Therapy: Perspectives and Challenges. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article ID: 889799. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.889799>
- [11] 刁永恩, 王昱, 罗云霞, 等. 中医药联合靶向药物治疗晚期肝癌患者的研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(11):1040-1044.
- [12] 李梦阁, 党志博, 王宇亮, 等. 基于真实世界研究复方斑蝥胶囊辅助治疗乙型肝炎相关原发性肝癌的临床疗效[J]. 中医临床研究, 2021, 13(32): 76-80.

- [13] 张林, 陆虹. 槐耳颗粒治疗乙型病毒性肝炎相关肝癌术后患者的临床观察[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2023, 7(8):25-28.
- [14] 邓鑫, 李璇, 梁健. 胃宁颗粒联合化疗治疗进展期胃癌的临床研究[J]. 微创医学, 2012, 7(2): 102-105.
- [15] Hopkins, A.L. (2007) Network Pharmacology. *Nature Biotechnology*, **25**, 1110-1111. <https://doi.org/10.1038/nbt1007-1110>
- [16] 董培良, 李慧, 韩华. 中药网络药理学的应用与思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 204-211.
- [17] 马伟, 孙嘉莹, 任伟超, 等. 网络药理学——中医药研究开发的新技术[J]. 世界中医药, 2023, 18(3):412-415.
- [18] 李媛媛, 王思斯, 法缇玛·瑟菲迪肯, 等. 基于网络药理学和分子对接技术及实验验证探讨江南卷柏治疗喉癌分子机制[J]. 中国药理学通报, 2024(2): 352-362.
- [19] Fan, J.H., Xu, M.M., Zhou, L.M., *et al.* (2022) Integrating Network Pharmacology Deciphers the Action Mechanism of Zuojin Capsule in Suppressing Colorectal Cancer. *Phytomedicine*, **96**, Article ID: 153881. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153881>
- [20] Liang, M.K., Liang, X.Q., Zhong, J., *et al.* (2021) Integrative Analysis of Epigenomics, Transcriptomics, and Proteomics to Identify Key Targets and Pathways of Weining Granule for Gastric Cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, **270**, Article ID: 113787. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113787>
- [21] Folkman, J. (1990) What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent? *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **82**, 4-6. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.1.4>
- [22] Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., *et al.* (1995) Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, **146**, 1029-1039.
- [23] Lu, D., Shen, J., Vil, M.D., *et al.* (2003) Tailoring *in Vitro* Selection for a Picomolar Affinity Human Antibody Directed against Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 for Enhanced Neutralizing Activity. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 43496-43507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307742200>
- [24] Scott, L.J. (2018) Apatinib: A Review in Advanced Gastric Cancer and Other Advanced Cancers. *Drugs*, **78**, 747-758. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0903-9>
- [25] Park, H., Cho, S.Y., Kim, H., *et al.* (2015) Genomic Alterations in BCL2L1 and DLC1 Contribute to Drug Sensitivity in Gastric Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 12492-12497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507491112>
- [26] Yoo, Y.D., Park, J.K., Choi, J.Y., *et al.* (1998) CDK4 Down-Regulation Induced by Paclitaxel Is Associated with G1 Arrest in Gastric Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, **4**, 3063-3068.
- [27] Li, X., Chen, Y., Wang, L., *et al.* (2016) Quercetin Alleviates Pulmonary Angiogenesis in a Rat Model of Hepatopulmonary Syndrome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **49**, e5326. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165326>
- [28] Wu, J., Ke, X., Ma, N., *et al.* (2016) Formononetin, an Active Compound of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge, Inhibits Hypoxia-Induced Retinal Neovascularization via the HIF-1 α /VEGF Signaling Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, 3071-3081. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S114022>
- [29] Shang, H.S., Lu, H.F., Lee, C.H., *et al.* (2018) Quercetin Induced Cell Apoptosis and Altered Gene Expression in AGS Human Gastric Cancer Cells. *Environmental Toxicology*, **33**, 1168-1181. <https://doi.org/10.1002/tox.22623>
- [30] Li, T., Zhao, X., Mo, Z., *et al.* (2014) Formononetin Promotes Cell Cycle Arrest via Downregulation of Akt/Cyclin D1/CDK4 in Human Prostate Cancer Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **34**, 1351-1358. <https://doi.org/10.1159/000366342>
- [31] Wan, Q., Wang, H., Lin, Y., *et al.* (2013) Effects of Quercetin on CDK4 mRNA and Protein Expression in A549 Cells Infected by H1N1. *Biomedical Reports*, **1**, 766-770. <https://doi.org/10.3892/br.2013.141>
- [32] Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., *et al.* (2014) Discovery and Saturation Analysis of Cancer Genes across 21 Tumour Types. *Nature*, **505**, 495-501. <https://doi.org/10.1038/nature12912>
- [33] Tan, A.C. (2020) Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Thoracic Cancer*, **11**, 511-518. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13328>
- [34] Wang, B.H., Wang, L.L., Lu, Y.X., *et al.* (2021) GRSF1 Promotes Tumorigenesis and EMT-Mediated Metastasis through PI3K/AKT Pathway in Gastric Cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **555**, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.03.121>
- [35] Huang, L., Guan, S., Feng, L., *et al.* (2022) Integrated Analysis Identified NPNT as a Potential Key Regulator in Tumor Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *Gene*, **825**, Article ID: 146436. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146436>
- [36] 赵晓苇, 周静萍, 毕于蓝, 等. PI3K/AKT 信号通路在促进口腔鳞癌侵袭转移中的作用[J]. 皖南医学院学报, 2019, 38(1): 75-79.