

基于网络药理学和细胞实验探讨补肾益气活血方对宫颈炎癌转化的作用

陈 民¹, 刘小琴¹, 陈媛媛¹, 陆文鹏¹, 徐海荣¹, 崔树娜^{1,2*}

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225000; 2. 扬州大学附属医院妇产科, 江苏 扬州 225009)

摘要: **目的** 基于网络药理学和细胞实验探讨补肾益气活血方对宫颈炎癌转化的作用机制。**方法** 通过 TCMSP、Swiss Target Prediction 和 GeneCards 数据库检索药物活性成分及作用靶点; 通过 GeneCards 数据库检索炎症相关基因, GEO 数据库获取宫颈癌相关数据集 (GSE63678、GSE63514), 差异分析后筛选炎症转化基因作为疾病治疗靶标; 采用 Cytoscape 软件构建药物-成分-疾病调控网络及筛选核心靶点; R 语言进行 KEGG 和 GO 富集分析; 对核心靶点及其对应成分进行分子对接验证。体外通过 CCK-8、Griess 法、Transwell 实验、CBA 实验、Western blot 等验证补肾益气活血方的抗炎作用。**结果** 共筛选得到 117 种活性成分, 对应靶点 1 801 个; 炎症转化基因 189 个; 疾病与药物共同靶点 82 个。KEGG 富集分析显示 TNF、AGE-RAGE、Toll 样受体信号通路等参与补肾益气活血方的抗炎癌转化作用。体外实验结果显示, 补肾益气活血方可抑制 LPS 诱导的巨噬细胞的增殖 ($P<0.05$, $P<0.01$), 促进其迁移 ($P<0.01$), 降低 NO、IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 并抑制 iNOS 蛋白表达及 PI3K、Akt 蛋白的磷酸化 ($P<0.01$), 升高 IL-10、IFN- γ 、IL-12p70 水平 ($P<0.05$)。**结论** 本研究揭示了补肾益气活血方通过多靶点、多途径发挥抗炎癌转化作用, 为该方治疗宫颈炎癌转化提供理论及实验支持。

关键词: 补肾益气活血方; 炎症转化; 抗炎; 抗肿瘤; 网络药理学

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)06-2086-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.053

宫颈癌是女性第四大常见的恶性肿瘤, 严重威胁了女性生命健康^[1]。持续高危 HPV 感染是宫颈癌发病的诱因, 此外长期慢性炎症也是宫颈癌发生发展的潜在原因之一^[2], 该过程涉及活性氧、活性氮、细胞因子、趋化因子、生长因子、COX 酶、金属蛋白酶等, 这些介质共同参与细胞增殖、衰老和死亡的过程, 发挥基因突变、DNA 甲基化、血管生成等作用, 促进 HPV 诱导的宫颈癌的发展^[3]。因此, 有效控制慢性持续炎症对预防宫颈癌有着重要意义。

宫颈癌在中医中属“五色带”“癥瘕”“崩漏”等范畴, 其病机为正气不足、气血失和, 邪毒内蕴冲任、胞脉损伤, 湿热毒邪瘀结子门, 日久溃腐成脓或杂色带下, 乃本虚标实之证, 中医药可用于宫颈癌前病变及宫颈癌的各个时期, 扶正抑癌、活血散结为治疗的基本原则^[4-5]。补肾益气活血方为课题组基于数据挖掘和临床经验自拟而成, 具有补肾生髓、益气活血的功效^[6]。现代药理学研究表明, 方中药物具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、调节免疫等作用^[7-11]。课题组前期研究发现该方可诱导宫颈癌细胞自噬

和调控代谢重编程等来抑制宫颈癌转移^[12]。然而, 该方在宫颈炎癌转化过程中的作用及机制有待深入研究。因此, 本研究通过网络药理学探讨其药效物质基础及作用机制, 并通过初步实验证实其抗炎功效, 为其深入机制研究和临床研究奠定基础。

1 材料

1.1 数据库及软件 ETCM 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/index.html>); TCMSP 数据库 (<https://tcmispw.com/tcmisp.php>); Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>); String 11.5 在线平台 (<https://stringdb.org>); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>); PubChem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); R studio 软件; Cytoscape 3.8.2 软件; AutoDock Tools-1.5.6 软件; Pymol 软件。

收稿日期: 2023-07-19

基金项目: 国家自然科学基金 (81703969); 江苏省自然科学基金 (BK20211327); 江苏省高校自然科学重大项目 (21KJA360004); 江苏省中医药管理局科技专项 (2020ZX21); 江苏省大学生创新创业训练计划项目 (202111117080Y); 江苏省“青蓝工程”项目 (2022); 扬州大学高端人才计划 (2020)

作者简介: 陈 民 (1996—), 女, 硕士生, 从事中西医结合妇产科疾病研究。Tel: (0514) 87972215, E-mail: minchen19960109@163.com

* **通信作者:** 崔树娜 (1981—), 女, 博士, 教授, 从事中西医结合妇产科疾病研究。Tel: (0514) 87972215, E-mail: sncui@yzu.edu.cn

1.2 细胞 巨噬细胞系 RAW264.7 细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心，培养于含有 10% 胎牛血清（FBS）和 1% 青霉素-链霉素混合液（100×）的高糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM）中，在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 试剂 二甲基亚砜（DMSO，批号 D8370）、脂多糖（LPS，批号 L6511）均购自美国 Sigma 公司；DMEM 高糖培养基（批号 C11995500BT）购自美国 Life 公司；胎牛血清（批号 11011-8611）购自浙江天杭生物科技股份有限公司；Transwell 小室（批号 3422）购自美国 Corning 公司；4% 多聚甲醛（批号 BL539A）购自合肥白鲨生物科技有限公司；RIPA 裂解液（批号 C1053）购自北京普利莱基因技术有限公司；10×PBS（批号 P1022-500）购自北京索莱宝科技有限公司；CCK-8 试剂盒（批号 B34304）购自美国 Selleck 公司；NO 检测试剂盒（批号 S0021M）、结晶紫染色液（批号 C0121）、APS（批号 ST005）、10% SDS（批号 ST628）、TEMED（批号 ST728）、BCA 蛋白试剂盒（批号 P0010）均购自上海碧云天生物科技股份有限公司；CBA 试剂盒购自美国 BD 公司；β-actin、iNOS、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 抗体（批号 4970S、13120S、4228S、4257S、4060S、4691S）均购自美国 CST 公司。

1.4 药物 补肾益气活血方组方药材黄芪（批号 202112，产地江苏）、当归（批号 202112，产地江苏）、鸡血藤（批号 202112，产地安徽）、熟地（批号 202112，产地安徽）、淫羊藿（批号 202112，产地安徽）、丹参（批号 202112，产地江苏）均购自扬州康之家大药房，经扬州大学杨长水副教授鉴定为正品。将以上中药按 6：3：3：4：4：6 比例混合后，使用粉碎机（型号 YB-2500A，永康市速锋工贸有限公司）粉碎，加入 50% 乙醇，加热至沸腾后文火加热 2 h，过滤。药渣中再加入适量 50% 乙醇，加热至沸腾后文火加热 1 h，过滤，合并 2 次滤液，使用旋转蒸发仪（型号 R206B，上海申生科技有限公司）浓缩成浸膏状，于 45 ℃ 烘箱中烘干，得到浸膏，于 4 ℃ 冰箱中保存。称取 400 mg 浸膏溶于 1 mL DMSO 中，超声充分溶解，得到储备液；再根据实验需要配制工作液，采用细胞培养液将储备液按比例稀释。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 中药信息收集及靶标数据库构建 在 ETCM 数据库中查找复方所含 6 味中药（丹参、当归、黄芪、鸡血藤、熟地黄、淫羊藿）的归经信息，并构建归经网络图。在 TCMSP 数据库中，以口服利用度（OB）≥30%，类药性（DL）≥0.18 为条件筛选复方中药物的有效活性成分。

2.1.2 药物靶点预测 对方中 6 味中药的主要活性成分对应的靶点以 3 个途径查询收集，①在 GeneCards 数据库中以中药的主要活性成分为关键词查找并以 score>中位数筛选对应的靶点；②在 Swiss Target Prediction 数据库中以中药的主要活性成分为关键词查找并根据 probability>0 筛选对

应的靶点；③在 TCMSP 数据库中以中药的主要活性成分为关键词查找并整理对应的靶点。之后利用 Uniprot 数据库将各活性成分进行归一化和标准化命名，并对靶点进行整合去重以及去除非人源靶蛋白^[13]，最终得到 6 味中药调控的靶点。

2.1.3 疾病靶点筛选 通过 PubMed 数据库中“MeSH Term”查询炎症的标准化表达“inflammation”“innate inflammatory response”“inflammatory response, innate”等，宫颈癌的标准化表达“cervical cancer”“cancer of cervix”“cervix cancer”等。在 GeneCards 数据库中以“inflammation”为关键词查询筛选，得到炎症对应的疾病靶点，以 score>中位数筛选，利用 Uniprot 数据库进行整合去重、标准化以及去除非人源靶蛋白。利用 GEO 数据库，以“cervical cancer”为检索词进行筛选，下载 GSE63678、GSE63514 数据集及对应 GPL 平台文件，使用 R 软件中的“Limma”包以 lgFC（FC 表示差异倍数）>1、矫正后 P 值（adjPvalue）<0.05 为条件筛选出差异表达基因，这些基因作为宫颈癌的疾病作用靶点。将上述炎症相关基因及宫颈癌差异表达基因取交集，得到宫颈炎症癌转化相关基因^[14]。

2.1.4 药物与疾病共同靶点筛选及“药物-成分-靶点”调控网络构建 将“2.1.2”项下中药物靶点与“2.1.3”项下获取的宫颈炎症癌转化基因取交集，并结合之前获取的药物活性成分及靶点关系数据，利用 Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点”调控网络。

2.1.5 聚类子网络构建及药物与疾病的核心靶点筛选 将炎症癌转化相关基因靶点导入 String 数据库，得到靶点间的关系文件，利用 Cytoscape 软件构建蛋白互作网络拓扑结构图，标记出药物与疾病的共同靶点，使用 MCODE 插件进行聚类分析，得到关键子网络。将疾病与药物共同靶点导入 String 数据库，获取蛋白互作关系文件，导入 Cytoscape 利用“CytoNCA”插件计算互作网络的自由度（Degree）、介数（Betweenness）和中心性（Closeness），以大于中位数为条件，经过 2 次筛选得到核心靶点。

2.1.6 GO 和 KEGG 富集分析 使用 R 软件中相关的 Bioconductor 安装包，设置 P=0.05，Q=0.05 进行靶点基因 GO 富集分析，绘制生物过程（BP）、细胞组分（CC）、分子功能（MF）条形图。同样方法进行 KEGG 分析，并结合 GEO 数据集中差异基因的检测量绘图。

2.1.7 分子对接 在 PDB 数据库中筛选并下载核心靶蛋白的 3D 结构“.pdb”格式文件；从 PubChem 中得到复方中关键有效活性成分作为配体，并导入 Chem3D 软件得到优化后的 3D 结构；运用 PyMol 软件对蛋白质进行去水、加氢等操作，通过 Auto Dock 软件进行分子对接，PyMol 软件分析对接部分的相互作用。

2.2 细胞实验

2.2.1 CCK-8 实验 取对数期细胞（1×10⁶/mL）接种于 96 孔板，培养 2 h 待细胞贴壁后加药。本研究采用 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞作为体外炎症模型^[15]，观察不同质量

浓度药物 (200、400、800 $\mu\text{g/mL}$)^[12]对 RAW264.7 细胞及 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞增殖的影响, 药物加或不加 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 共刺激细胞 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 轻摇细胞培养板混匀后, 继续将其置于恒温培养箱 (美国 Thermo 公司) 培养 1 h, 用酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司) 在 450 nm 波长处检测各孔的光密度 (OD) 值。

2.2.2 NO 水平检测 参考文献 [16] 报道, 细胞培养方法同“2.2.1”项, 细胞贴壁 2 h 后加 LPS 及不同质量浓度药物处理, 于培养箱培养 24 h 后, 每孔取 50 μL 上清液置于 96 孔板中, 加等体积的 Griess 试剂, 室温下避光孵育 10 min, 用酶标仪上测定 540 nm 波长处的吸光度, 以标准曲线计算各组培养液中 NO_2^- 水平。

2.2.3 Transwell 实验 取对数期细胞 ($5\times 10^5/\text{mL}$) 接种于 Transwell 细胞培养室中。Transwell 上室每孔加入 200 μL 细胞悬液, 培养基为无血清的 DMEM, 分别加入不同质量浓度药物, 并以等量溶剂作为对照组。Transwell 下室则每孔加入 500 μL 含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 于恒温培养箱中培养 24 h 后取出, 用 4% PFA 固定膜下细胞并用结晶紫染色。使用倒置显微镜 (型号 XD-202, 南京江南永新光学有限公司) 和 Image J 软件对每个小室的 5 个随机场中的细胞进行计数。计算迁移百分比, 并与 LPS 处理下的迁移百分比进行比较。

2.2.4 细胞因子水平检测 参考文献 [13] 报道, 取对数期细胞 ($1\times 10^5/\text{mL}$) 接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 加入 LPS 及不同质量浓度药物刺激 5 h 后取细胞培养上清液, 离心后收集细胞上清于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。将标准品按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 比例梯度稀释, 严格按照试剂盒说明书操作, 用流式细胞仪 (LSR Fortessa 美国 BD 公司) 检测各组上清中细胞因子水平, 根据标准曲线计算样本中 IL-6、TNF- α 、MCP-1、IL-10、INF- γ 、IL-12p70 水平。

2.2.5 Western blot 实验 LPS 及不同质量浓度药物共作用 RAW264.7 细胞不同时间点后 (p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 共作用 15 min, iNOS 共作用 24 h), 收集细胞, 参照 RIPA 裂解液说明书于冰上裂解细胞。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜上, 用 5% BSA 封闭 2 h 后加入一抗孵育过夜, 加入二抗孵育 1.5 h, 超灵敏全自动成像分析系统 (美国 Protein Simple 公司) 曝光。

2.2.6 统计学分析 通过 SPSS 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 中药-归经网络分析 补肾益气活血方所含的 6 味中药归肝、心、脾、肺、肾经, 见图 1, 网络连接度排名前 3 位的是肝经、肾经、心经。

3.2 补肾益气活血方所含化合物及对应靶标筛选 得到符

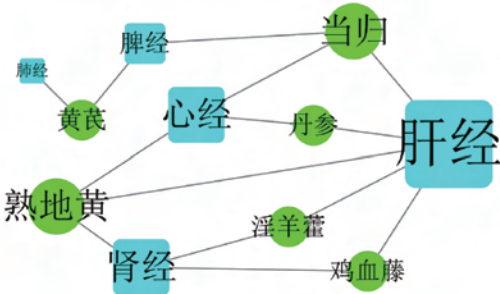


图 1 补肾益气活血方归经网络图

合筛选条件的各药物成分及靶点信息见表 1, 去重后得到有效成分 117 种, 对应靶点共 1 801 个。课题组前期采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术检测到组方中的中药成分也含有隐丹参酮、槲皮苷、淫羊藿苷、脱水淫羊藿素、 β -谷甾醇- β -D-葡萄糖苷等活性成分^[12], 与网络药理学预测结果相符合。

表 1 补肾益气活血方药物化合物、靶点信息表

中药名称	化合物数量/个	靶点数/个
丹参	62	708
当归	2	97
黄芪	18	1 319
鸡血藤	24	768
熟地黄	2	102
淫羊藿	22	662

3.3 宫颈癌差异基因分析 对 GEO 数据库中的宫颈癌数据集 (GSE63678、GSE63514) 进行合并, 去除批次效应后做差异分析, 得到差异基因 1 021 个, 其中上调基因 539 个, 下调基因 482 个。对差异分析结果进行可视化, 得到相关火山图 (图 2A) 及热图 (图 2B), 火山图中红色表示上调基因, 绿色表示下调基因, 黑色表示基因间无显著差异。热图中包含 2 组 GSE 数据集, t1 为正常组, t2 为疾病组; 红色表示高表达, 绿色表示低表达。

3.4 炎症转化相关基因分析 将炎症相关基因与宫颈癌差异基因取交集, 见图 3, 图中蓝色代表炎症相关基因, 红色代表宫颈癌相关基因, 两者重叠部分有 189 个基因, 为炎症与宫颈癌共同基因, 可视作炎症转化相关基因。

3.5 药物-成分-靶点调控网络图 利用 Cytoscape 软件绘制药物-成分-靶点调控网络图, 见图 4, 对应靶点数较多的成分是叶酸、槲皮素、木樨草素、山柰酚等; 对应成分较多的靶点是 AR、HSD11B1、PIK3CA、PGR 等。

3.6 聚类分析网络图与核心靶点筛选 将药物与疾病靶点进行蛋白互作网络构建, 并通过 Cytoscape 的插件 MCODE 对疾病相关靶点进行聚类分析, 找到共包含 11 个点、26 条边的关键子网络, PPI 网络中红色为炎症共同的疾病靶点, 含绿色的为药物与疾病的共同靶点, 见图 5A。同时对药物与疾病的共同靶点另外构建了蛋白互作网络, 并对 PPI 网络进行 Degree、Betweenness、Closeness 算法拓扑分析得到核心基因, 筛选条件均为大于中位值, 见图 5B, 由此可知 IL-6、PI3KCA、PI3KR1 及 VEGFA 在蛋白互作中有

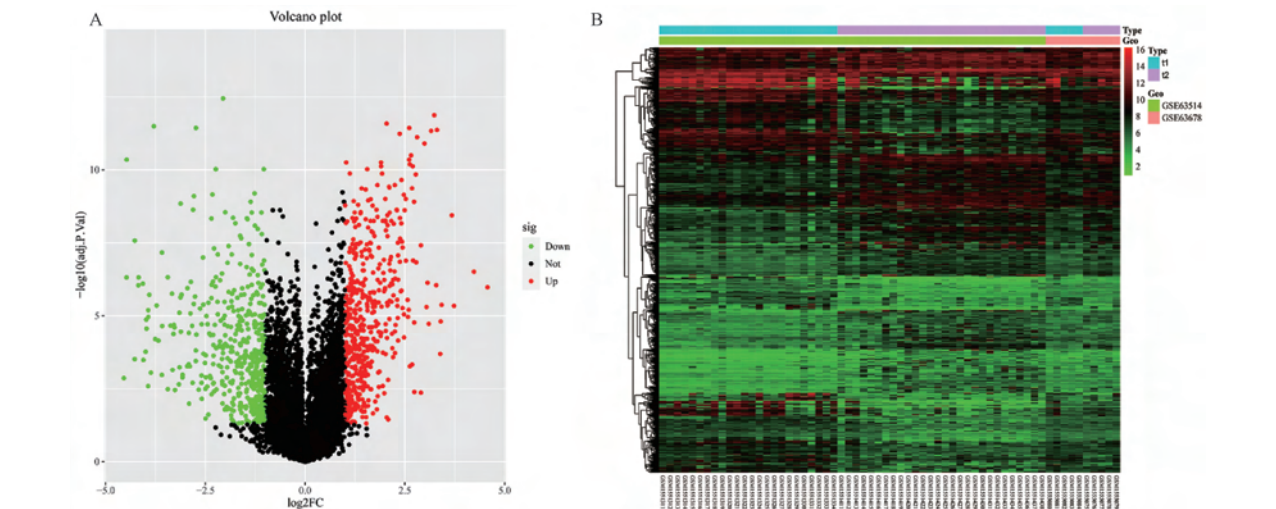


图 2 宫颈癌差异基因火山图 (A) 和热图 (B)

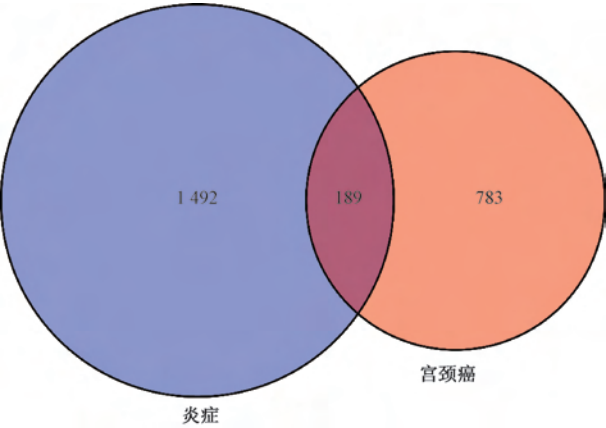
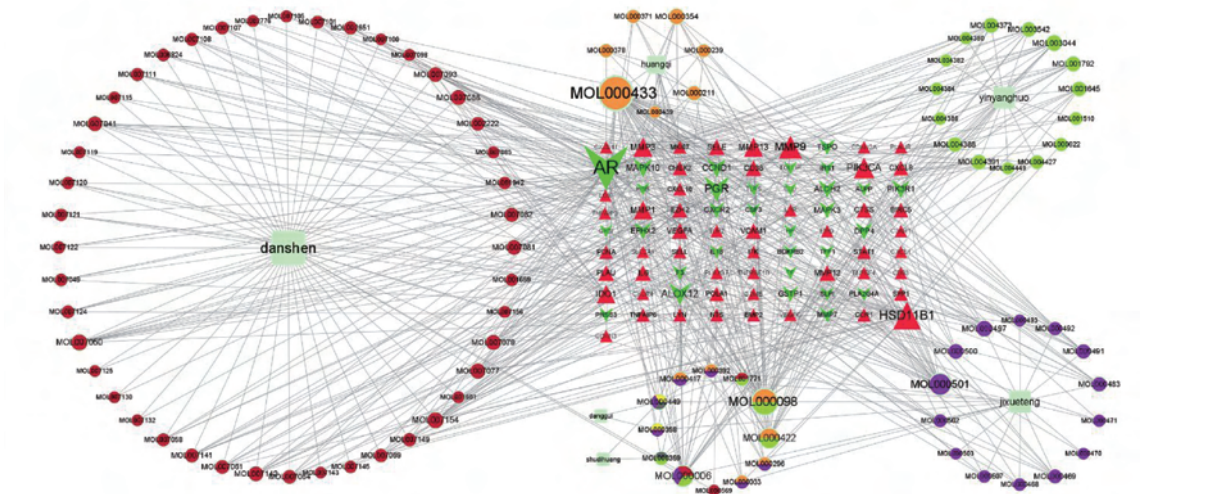
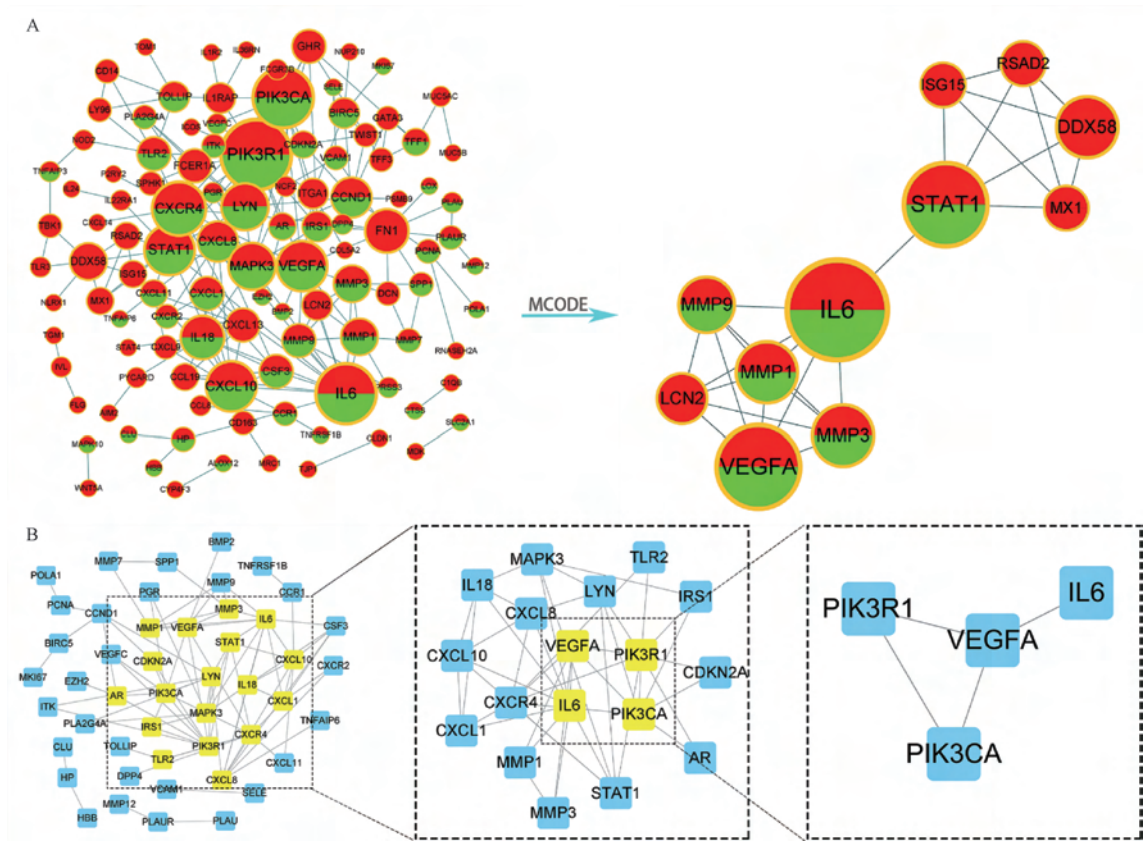


图 3 炎症相关基因与宫颈癌差异基因韦恩图

关键作用，可作为核心靶点进行后续研究。

3.7 富集分析 使用 R 软件对复方针对宫颈炎癌转化的潜在作用靶点进行 GO 富集分析，见图 6A，BP 主要涉及富集于白细胞迁移、细胞对 LPS 的反应、对细菌起源分子的反应、细胞趋化作用等；CC 主要涉及分泌颗粒腔胞质囊泡腔、第三粒腔、特异性颗粒等；MF 主要涉及受体配体活动、信号受体激活物活性、细胞因子活性等。使用 R 软件进行 KEGG 富集分析，共富集到 125 条通路，前 20 条通路见图 6B，涉及 TNF 信号通路、AGE/RAGE 信号通路、Toll 样受体信号通路、IL-17 信号通路等。通路互作网络图见图 6C，显示了部分关系最为密切的通路，体现了药物对疾病作用的多通路性。关键通路与其对应靶点的调控关系见图 6D。





注：红色为疾病靶点，绿色+红色为疾病与药物共同靶点。
图 5 聚类分析网络 (A) 和疾病与药物的核心靶点 (B) 筛选

于-5 kcal/mol，说明这些有效成分与核心靶点结合稳固。分子对接示意图见图 7。

表 2 分子对接得分表

编号	药物成分	靶点(结构)	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
A	常春藤皂苷元	IL-6(4N17)	-8.2
B	木樨草素	IL-6(4N17)	-7.6
C	槲皮素	IL-6(4N17)	-7.9
D	槲皮素	PIK3CA(7JIU)	-8.7
E	木樨草素	PIK3R1(IH90)	-6.5
F	山柰酚	PIK3R1(IH90)	-6.2
G	槲皮素	PIK3R1(IH90)	-6.7
H	木樨草素	VEGFA(4KZN)	-6.0
I	槲皮素	VEGFA(4KZN)	-6.0

3.9 补肾益气活血方对 RAW264.7 细胞增殖的影响 如图 8A 所示，与空白组比较，溶剂组对细胞增殖无明显影响 ($P>0.05$)；与溶剂组比较，不同质量浓度补肾益气活血方组 (200~800 $\mu\text{g/mL}$) 均可促进细胞的增殖，且呈剂量依赖性 ($P<0.05$, $P<0.01$)。如图 8B 所示，与空白组比较，模型组可促进细胞增殖 ($P<0.01$)；与模型组比较，800 $\mu\text{g/mL}$ 补肾益气活血方组能抑制 LPS 诱导的巨噬细胞增殖 ($P<0.05$)。

3.10 补肾益气活血方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞迁移能力的影响 如图 9 所示，空白组巨噬细胞较少迁移，与空白组比较，模型组细胞迁移率升高 ($P<0.01$)；与模型

组比较，200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 补肾益气活血方组细胞迁移率升高 ($P<0.01$)，且呈剂量依赖性，细胞迁移促进率分别为 115%、173%、189%。

3.11 补肾益气活血方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 水平和 iNOS 蛋白表达的影响 图 10A 所示，与空白组比较，模型组 RAW264.7 细胞 NO 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，补肾益气活血方各剂量组 RAW264.7 细胞 NO 水平降低 ($P<0.01$)，且呈剂量依赖性。如图 10B~10C 所示，与空白组比较，模型组 RAW264.7 细胞 iNOS 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，补肾益气活血方各剂量组 RAW264.7 细胞 iNOS 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，且呈剂量依赖性。

3.12 补肾益气活血方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中细胞因子水平的影响 如图 11 所示，与空白组比较，模型组细胞 IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，补肾益气活血方各剂量组 TNF- α 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，400、800 $\mu\text{g/mL}$ 补肾益气活血方组 IL-6 水平降低 ($P<0.01$)，IL-12p70 水平升高 ($P<0.05$)，400 $\mu\text{g/mL}$ 补肾益气活血方组 IL-10、IFN- γ 水平升高 ($P<0.05$)，800 $\mu\text{g/mL}$ 补肾益气活血方组 MCP-1 水平降低 ($P<0.05$)。

3.13 补肾益气活血方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响 如图 12 所示，与空白组比较，

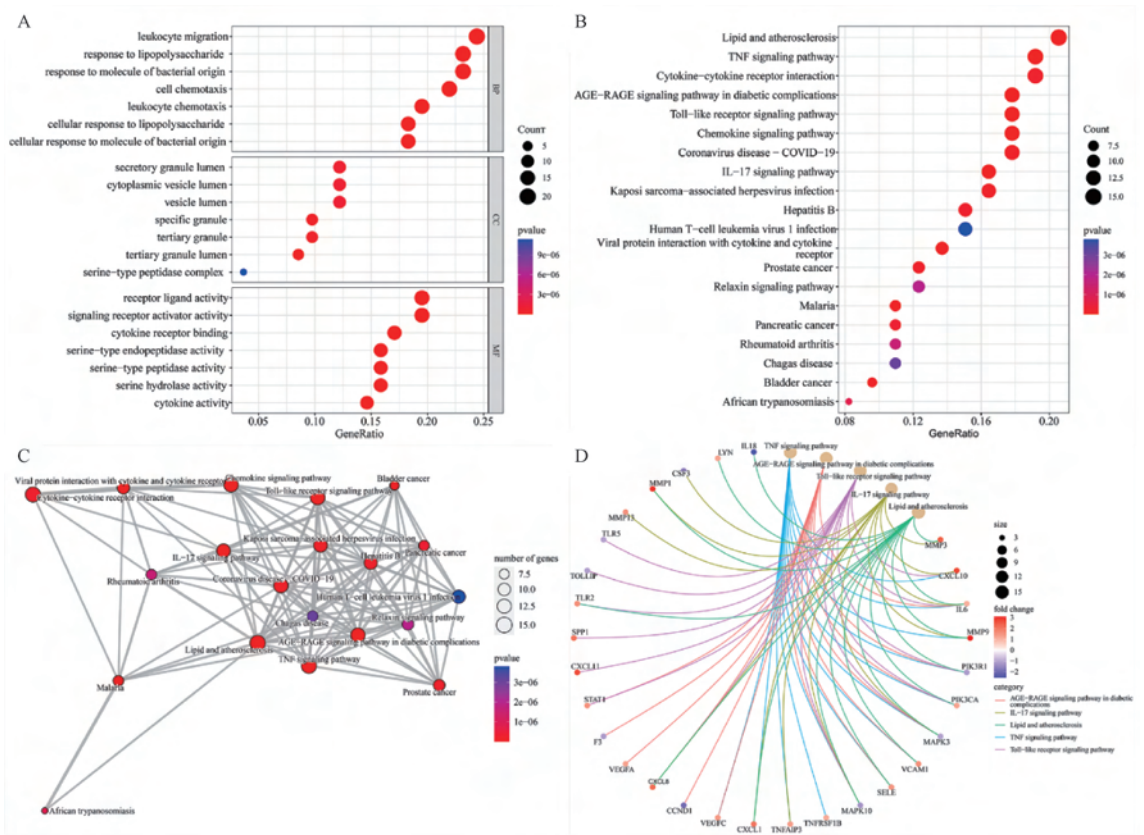
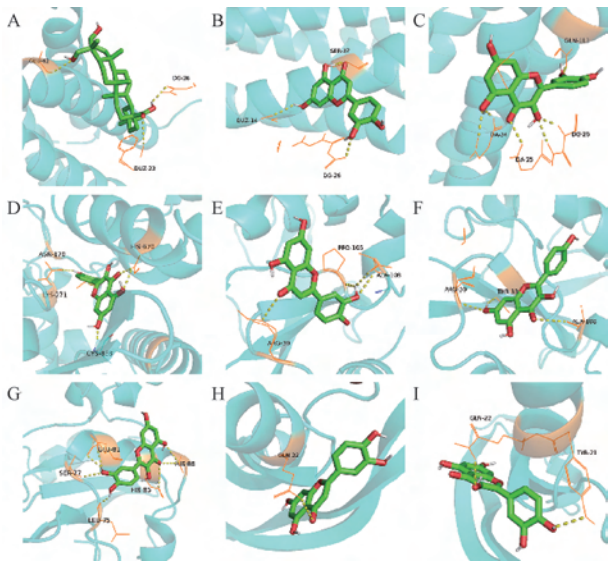


图 6 补肾益气活血方针对宫颈癌转化潜在作用靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路分析



注：A 为 IL-6 与常春藤皂苷元，B 为 IL-6 与木樨草素，C 为 IL-6 与槲皮素，D 为 PIK3CA 与槲皮素，E 为 PIK3R1 与木樨草素，F 为 PIK3R1 与山柰酚，G 为 PIK3R1 与槲皮素，H 为 VEGFA 与木樨草素，I 为 VEGFA 与槲皮素。

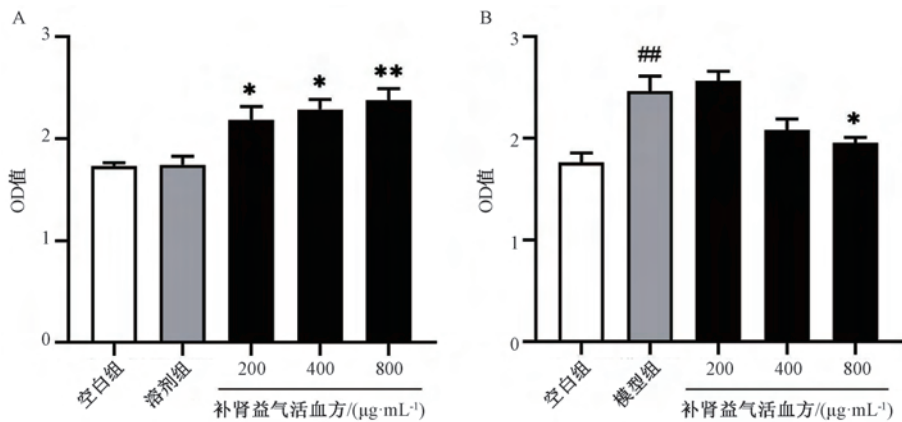
图 7 分子对接图

模型组细胞 PI3K、Akt 的磷酸化水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，补肾益气活血方各剂量组细胞 PI3K 的磷酸化水平降低 ($P<0.01$)，400、800 $\mu\text{g/mL}$ 补肾益气活血方组 Akt 磷酸化水平降低 ($P<0.01$)，200 $\mu\text{g/mL}$ 补肾益气活血

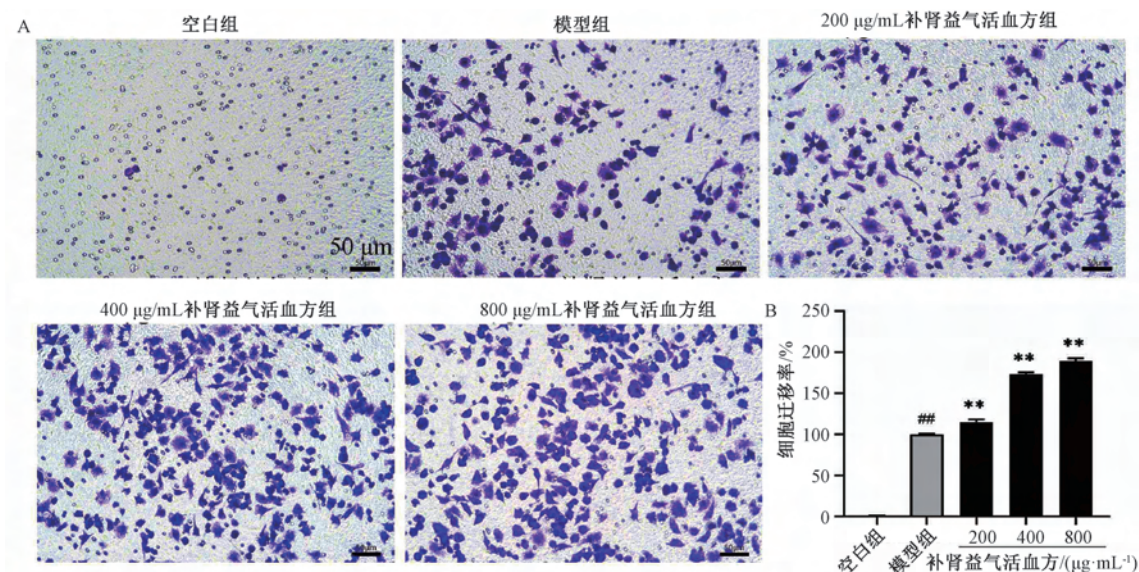
方组 Akt 磷酸化水平升高 ($P<0.01$)，提示 400、800 $\mu\text{g/mL}$ 补肾益气活血方能够调控炎症状态下 PI3K/Akt 信号通路的激活。

4 讨论

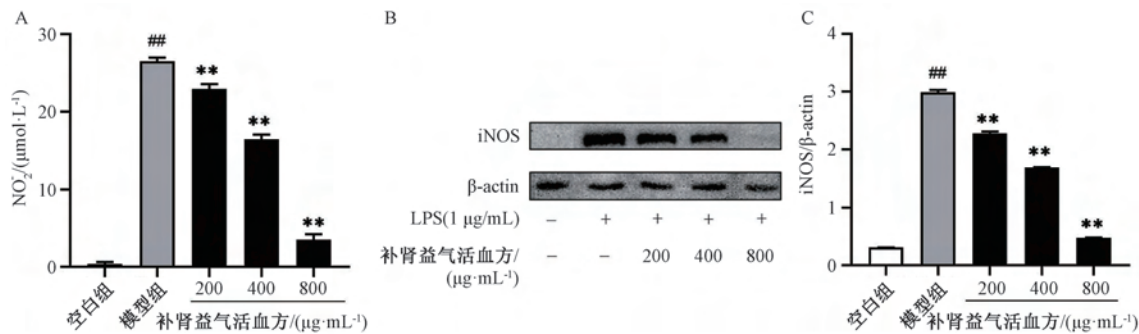
课题组前期研究发现补肾益气活血方可通过调控 PI3K/Akt 通路，诱导宫颈癌细胞自噬、调控代谢重编程等起到抗宫颈癌的作用^[12]。本研究发现补肾益气活血方通过调控 IL-6、PIK3CA、PIK3R1、VEGFA 等靶点，调控 TNF、AGE/RAGE、Toll 样受体通路等作用于宫颈炎症转化进程。IL-6 是常见的促炎因子，其高表达与宫颈癌细胞的增殖、分化等有关，降低其水平可抑制宫颈癌细胞的生长^[18]。本研究也发现补肾益气活血方能降低 LPS 诱导的巨噬细胞 IL-6 的水平。PIK3CA 是宫颈癌中最常发生突变的癌基因，其突变能影响宫颈癌细胞 DNA 的损伤修复，研究发现其突变可介导谷氨酰胺等代谢途径降低宫颈癌放疗敏感性，PI3K 抑制剂可提高其放疗敏感性^[19]。PIK3R1 是 PI3K (p85 α) 的调节亚基，研究认为 PIK3R1 突变激活会促使 PI3K 信号增加，进而促进机体组织的癌变^[20]。VEGFA 可通过 PI3K/Akt 等通路促进血管的生成，释放多种细胞因子，参与肿瘤形成^[21]。最新 NCCN 指南以靶向 VEGF 的药物贝伐珠单抗为基础作为治疗复发转移性宫颈癌的一线首选方案^[22]。PI3K/Akt 通路参与调节以上多个核心靶点，为炎症、肿瘤发生发展的关键通路^[23]，因此，通过靶向这些分子抑制宫颈炎症癌进展有着重要的价值，本研究结果证实了补肾益气



注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与溶剂组或模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。
图 8 补肾益气活血方对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。
图 9 补肾益气活血方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

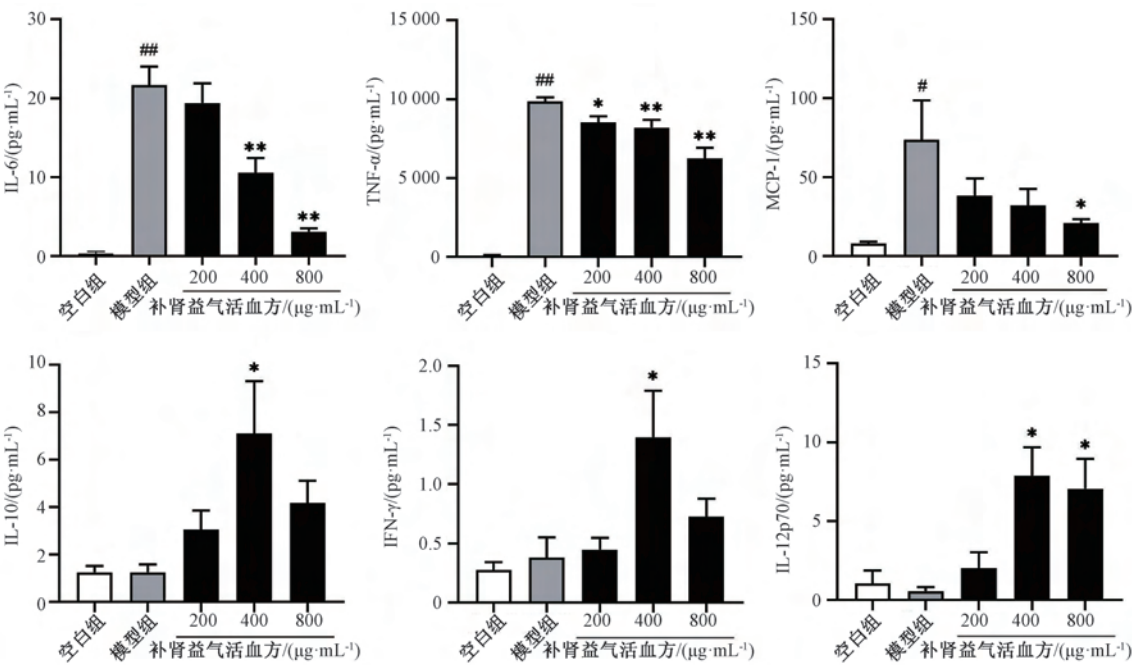


注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。
图 10 补肾益气活血方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 水平及 iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

活血方能够抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活，进一步揭示了补肾益气活血方能通过调控 PI3K/Akt 通路的激活抑制炎症的发生。

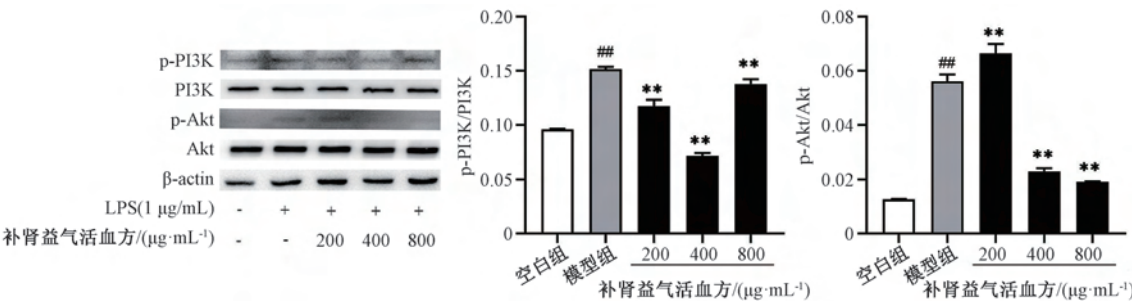
炎症过程中所产生的活性氧、活性氮、细胞因子等物质在炎症相关的肿瘤发病过程中起重要作用^[3]。通过体外实验进一步明确，补肾益气活血方可降低 LPS 诱导的巨噬细胞的增殖及 NO、IL-6、TNF-α、MCP-1 水平，促进其迁移，升高 IFN-γ、IL-12p70 及抗炎因子 IL-10 的水平，抑制

2092



注：与空白组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 11 补肾益气活血方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的细胞因子水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

图 12 补肾益气活血方对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

iNOS 的表达。TNF- α 可通过募集嗜中性粒细胞和巨噬细胞来促进受益于炎症细胞因子和趋化因子的肿瘤生长^[24]，此外，TNF- α 可促进遗传变异在宫颈癌易感性中的潜在作用^[25]。MCP-1 可通过其趋化作用加重组织炎症性损伤、诱导 VEGF 及血管的生成等促进肿瘤的发生发展^[26]，研究发现其在高级别鳞状上皮内病变及宫颈癌周围组织中特别是肿瘤浸润前缘呈高表达^[27]。IL-12p70 作为 T 细胞刺激因子，可诱导 T 细胞增殖增强机体免疫^[28]，联合 IL-12 可提高抗 HPV16 相关宫颈癌 DNA 疫苗的效力^[29]。IFN- γ 可活化免疫细胞，并抑制宫颈癌 HeLa 细胞生长^[30]。本研究表明该方可通过降低炎症转化过程中的关键因子 IL-6、TNF- α 、MCP-1 水平，升高 IFN- γ 、IL-12p70 及 IL-10 的水平，对炎症转化这一进程起到保护作用。

慢性持续炎症及 HPV 感染促进了宫颈癌的发生发展。因此，系统地研究炎-癌恶性转化的过程及重要靶点，是未来实现宫颈癌早期预防、早期诊断和早期治疗的关键突破口。本研究揭示了补肾益气活血方在宫颈炎癌转化中的作

用机制，发现与 IL-6、PIK3CA、PIK3R1 等靶点有关，涉及通路主要为 TNF、AGE/RAGE、Toll 样受体通路等，为该方在宫颈炎癌转化预防应用、临床转化及深入的实验研究提供方向。

参考文献：

[1] Murata M. Inflammation and cancer[J]. *Environ Health Prev Med*, 2018, 23(1): 50.

[2] Buskwofie A, David-West G, Clare C A. A review of cervical cancer: Incidence and disparities[J]. *J Natl Med Assoc*, 2020, 112(2): 229-232.

[3] Fernandes J V, DE Medeiros Fernandes T A, DE Azevedo J C, et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (review) [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(3): 1015-1026.

[4] 郭永红. 李光荣教授治疗宫颈癌前病变及宫颈癌的经验[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(10): 2967-2969.

[5] 韩凤娟, 姜婷婷, 张 茗. 中医药在宫颈炎治疗中的作用及

其机制研究[J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37(1): 80-83.

[6] 崔树娜, 胡雪琴, 温先荣. 基于关联规则挖掘的白细胞减少症方药规律分析[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2014, 38(1): 23-26.

[7] 李 玥. 浅谈复方丹参方的组成及药理药效研究[J]. 药品评价, 2020, 17(4): 25-26.

[8] 向 璐, 张巧艳, 赵琦明, 等. 黄芪-当归化学成分、药理作用及临床应用的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(7): 2196-2213.

[9] 高志杰, 朱彤彤, 牛新茹, 等. 鸡血藤化学成分及药理活性研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(4): 67-74.

[10] 陈媛媛, 李 敏, 崔树娜. 基于网络药理学的淫羊藿调节免疫耐受作用机制研究[J]. 扬州大学学报 (农业与生命科学版), 2022, 43(2): 69-77.

[11] 葛 楠, 闫广利, 孙 晖, 等. 熟地黄药效物质基础研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(1): 292-302.

[12] 陈媛媛. 补肾益气活血方加减调控细胞自噬和糖代谢重编程抑制宫颈癌转移机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.

[13] Hu L, Li S, Cui S, *et al.* A systematic study of mechanism of *Sargentodoxa cuneata* and *Patrinia scabiosifolia* against pelvic inflammatory disease with dampness-heat stasis syndrome *via* network pharmacology approach[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 582520.

[14] 赧 迪, 陶 志, 陈攀龙, 等. 吴茱萸干预胃炎-癌转化的潜在活性成分和机制研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(9): 2105-2109.

[15] Cui S, Chen S, Li S, *et al.* A network pharmacology approach to investigate the anti-inflammatory mechanism of effective ingredients from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106040.

[16] Cui S, Wu Q, Wang J, *et al.* Quercetin inhibits LPS-induced macrophage migration by suppressing the iNOS/FAK/paxillin pathway and modulating the cytoskeleton [J]. *Cell Adh Migr*, 2019, 13(1): 1-12.

[17] Liu X, Shao P, Cui S, *et al.* Anti-inflammatory mechanism of the optimized active ingredients of *Sargentodoxa cuneata* and *Patrinia villosa* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110337.

[18] Pan Y, Huang J, Liu K, *et al.* Orai1-mediated store-operated Ca²⁺ entry promotes cervical cancer progression through IL-6 signaling[J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 1041674.

[19] Jiang W, Ouyang X, Ji Z, *et al.* The PIK3CA-E545K-SIRT4 signaling axis reduces radiosensitivity by promoting glutamine metabolism in cervical cancer [J]. *Cancer Lett*, 2023, 556: 216064.

[20] Vallejo-Díaz J, Chagoyen M, Carrera A C, *et al.* The opposing roles of PIK3R1/p85α and PIK3R2/p85β in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(4): 233-244.

[21] Zhang W, Xiong Z, Wei T, *et al.* Nuclear factor 90 promotes angiogenesis by regulating HIF-1α/VEGF-A expression through the PI3K/Akt signaling pathway in human cervical cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 276.

[22] 彭巧华, 吕卫国. 2022 年第 1 版《NCCN 子宫颈癌临床实践指南》解读[J]. 实用肿瘤杂志, 2022, 37(3): 205-214.

[23] Huang X, Li Z, Zhang Q, *et al.* Circular RNA Akt3 upregulates PIK3R1 to enhance cisplatin resistance in gastric cancer *via* miR-198 suppression[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 71.

[24] Salomon B L, Leclerc M, Cohen J L, *et al.* Tumor necrosis factor α and regulatory T cells in oncoimmunology [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 444.

[25] Deshpande A, Nolan J P, White P S, *et al.* TNF-α promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer[J]. *J Infect Dis*, 2005, 191(6): 969-976.

[26] Yoshimura T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(4): 335-345.

[27] Kleine-Lowinski K, Gillitzer R, Rösl F, *et al.* Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1) -gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 1999, 82(1): 6-11.

[28] Nguyen K G, Vrabel M R, Mantooth S M, *et al.* Localized interleukin-12 for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575597.

[29] Ajorloo M, Alamdary A, Nikoo H R, *et al.* Immunization of mice by the co-administration of codon-optimized HPV16 E7 and IL12 genes against HPV16-associated cervical cancer[J]. *Microb Pathog*, 2019, 132: 20-25.

[30] Yang S L, Tan H X, Niu T T, *et al.* The IFN-γ-IDO1-kynureine pathway-induced autophagy in cervical cancer cell promotes phagocytosis of macrophage[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(1): 339-352.