

基于网络药理学和动物实验探讨甘遂-甘草药对 治疗恶性腹水的作用机制

何甜甜,唐大轩,刘亚欧,肖 杨,张 莉*

四川省中医药科学院,成都 610041

摘要:基于网络药理学和动物实验探究甘遂-甘草(Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, KR-GRR)药对治疗恶性腹水(malignant ascites, MA)的作用机制。采用TCMSP数据库筛选药物活性成分与作用靶点,通过网络药理学预测药对治疗MA的靶点与信号通路,并构建蛋白互作网络,形成“中药-成分-疾病-靶点”的可视化图,GO和KEGG分析预测药对治疗MA的潜在作用机制。其次,通过分子对接验证活性成分与核心靶点的结合能力。最后采用H22肝癌细胞构建MA小鼠模型进行验证。网络药理学结果表明,KR-GRR药对治疗MA的核心成分有13个,相关靶点共51个,核心靶点为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤蛋白53(tumor protein 53, TP53)、IL-1 β 和基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)等。KEGG分析筛选出了141条信号通路,结合分子对接结果,推测PI3K/AKT1/MMP9信号通路在KR-GRR药对治疗MA的过程中发挥关键作用。动物实验结果显示,2.5 g/kg KR-GRR药对能明显改善MA小鼠一般状态、死亡情况和腹膜组织病理损伤,减小腹围和腹水量,抑制腹水中AKT1和MMP9的表达,抑制腹膜组织AKT1、TNF、IL-6、TP53、IL-1 β 、MMP9 mRNA和p-PI3K、PI3K、p-AKT1、AKT1、MMP9蛋白的表达以及p-PI3K/PI3K、p-AKT1/AKT1的比值。综上,KR-GRR药对可能通过抑制PI3K/AKT1/MMP9信号通路激活来发挥治疗MA的作用。

关键词:甘遂-甘草药对;恶性腹水;网络药理学;分子对接;PI3K/AKT1/MMP9信号通路

中图分类号:R285

文献标志码:A

文章编号:1001-6880(2026)9-2046-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2026.9.018

CSTR:32307.14.1001-6880.2026.9.018

Mechanism of Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma herb pair in treating malignant ascites based on network pharmacology and animal experiment

HE Tian-tian, TANG Da-xuan, LIU Ya-ou, XIAO Yang, ZHANG Li*

Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: This study aims to explore the mechanism of Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (KR-GRR) herb pair on malignant ascites (MA) by using network pharmacology and animal experiment. Firstly, the active components of KR-GRR herb pair and the corresponding targets were screened from the TCMSP database. The common targets and signaling pathways of KR-GRR herb pair in treating MA were predicted by network pharmacology, and a protein-protein interaction network was constructed to form a visualized map of Chinese Tradition medicine-components-diseases-targets. GO and KEGG analyses were used to predict the underlying mechanism of KR-GRR herb pair in treating MA. Secondly, molecular docking was employed to obtain the binding ability of the active components of KR-GRR herb pair to the core targets. Finally, the MA mice model was developed using H22 liver cancer cells for the mechanism validation. As a result, network pharmacology results indicated that 13 core bioactive components and 51 potential targets of KR-GRR against MA, with key targets including serine/threonine-protein kinase 1 (AKT1), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6 (IL-6), tumor protein 53 (TP53), IL-1 β , and Matrix

收稿日期:2025-07-21 接受日期:2025-12-17

基金项目:四川省省级科研院所基本科研业务费项目(2023JDKY0027);四川省省级科研院所青年才俊项目(QNCJRS2022-7)

* 通信作者 E-mail: zhangli556@126.com

metallopeptidase 9 (MMP9). A total of 141 signaling pathways were screened out by KEGG analysis, and molecular docking results suggested that the PI3K/AKT1/MMP9 signaling pathway played a pivotal role in the therapeutic effects of KR-GRR against MA. The animal experiment demonstrated that KR-GRR herb pair significantly improved the general condition, survival rate, and peritoneal histopathological damage in MA mice. Additionally, 2.5 g/kg of KR-GRR reduced abdominal circumference and ascites volume, and suppressed the expression of AKT1 and MMP9 in ascitic fluid. Furthermore, KR-GRR downregulated the mRNA levels of *AKT1*, *TNF*, *IL-6*, *TP53*, *IL-1 β* , and *MMP9* in peritoneal tissues, as well as the protein expression of p-PI3K, PI3K, p-AKT1, AKT1, and MMP9, especially the ratios of p-PI3K/PI3K and p-AKT1/AKT1. Taken together, KR-GRR herb pair may exert therapeutic effects against MA by inhibiting the activation of the PI3K/AKT1/MMP9 signaling pathway.

Key words: Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma herb pair; malignant ascites; network pharmacology; molecular docking; PI3K/AKT1/MMP9 signaling pathway

恶性腹水(malignant ascites, MA)是晚期恶性肿瘤常见的并发症之一。主要由卵巢癌、肝癌、胃癌和结直肠癌等腹膜转移引起,临床表现为顽固性腹胀、腹痛、呼吸困难及进行性恶病质。MA患者中位生存期为5~7个月,仅11%的患者存活时间超过6个月。现代医学主要采用利尿剂、腹腔穿刺引流与腔内化疗等治疗手段,但具有疗效短暂、易复发和不良反应等局限性^[1]。因此,迫切需要寻找治疗MA的有效药物以改善患者生存质量和延长生存期。

祖国医学依据临床症状,将MA归属为“臌胀”“积聚”等范畴,以攻逐水饮、补虚扶正为主要治则。近年来,中医药在治疗MA领域积累了丰富的临床经验,甘遂半夏汤已被证实对多病因引发的浆膜腔积液具有显著疗效,全方由甘遂、半夏、芍药和甘草4味中药组成,但传统中医理论认为处方中甘遂-甘草(Kansui Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, KR-GRR)药对配伍属于“十八反”中的禁忌组合,临床应避免同用。因此,现代药理学开展了甘遂半夏汤拆方研究,结果表明去除KR-GRR药对中的单味或两味药,攻逐水饮的作用反而明显降低,提示KR-GRR药对在甘遂半夏汤干预MA中具有突出贡献^[2]。进而,有研究直接证实KR-GRR药对干预MA模型大鼠有显著作用,可减缓MA大鼠腹水生成速度,降低腹水量,且未观察到明显毒性反应^[3],由此可见,KR-GRR药对配伍在MA治疗中具有潜在应用价值。阐明该药对干预MA的分子作用机制,为指导临床安全有效使用该药对奠定基础,是亟待解决的关键问题。因此,本研究采用网络药理学筛选KR-GRR药对的活性成分与作用靶点,并通过构建动物模型进行体内验证,旨在阐明该药对的活性成分和分子作用机制,为临床应用与现代开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 动物

60只SPF级雄性Balb/c小鼠,3~4周龄,体重15~17g,购自斯贝福(北京)生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。所有动物饲养于四川省中医药科学院SPF级动物中心,室温 20 ± 2 ℃,湿度50%~70%,明暗各12h,自由饮食进水。所有动物适应性喂养1周后开始造模。本实验经四川省中医药科学院动物使用与管理委员会批准(DWSYLI-2023-018)。

1.2 药物与试剂

醋甘遂(规格:1g等效于1g生药材)和炙甘草(规格:1g等效于1g生药材)配方颗粒(批号:2305002C、2306020S,华润三九医药股份有限公司)。

苏木素染液(批号:CR2305121,武汉塞维尔生物科技有限公司);伊红染液(批号:YE2080,合肥博美生物科技有限责任公司);丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)和基质金属蛋白酶9(matrix metallopeptidase 9, MMP9)ELISA试剂盒(批号:E20240920-16048、E20240920-16032,上海茁彩生物科技有限公司);TriQuick总RNA提取试剂(批号:2500060003,北京索莱宝科技有限公司);氯仿(批号:20220311,国药集团化学试剂有限公司);磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(phosphorylated phosphoinositide 3-kinase, p-PI3K)和MMP9抗体(批号:7912914、5048880,美国Affinity Biosciences公司);磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、磷酸化AKT1(p-AKT1)、AKT1和GAPDH抗体(批号:H681866012、H650607020、HO1213、H641513038,华安生物技术有限公司)。

1.3 仪器

LEGEND Micro 17R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Leica-2016 转轮式切片机(德国 Leica 公司);BMJ-A 组织包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);Pannoramic 250 数字切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司);SpectraMAX Plus384 酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司);ABI QuantStudio 1 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SCI1000-G 逆转录(美国 SCILOGEX 公司);80211ES05 垂直电泳槽(翌圣生物科技(上海)股份有限公司);EPSON Perfection V39 扫描仪(日本 EPSON 公司);Tanon 4800 曝光仪(上海天能生命科学有限公司)。

1.4 网络药理学分析

1.4.1 KR-GRR 药对活性成分和潜在作用靶点的获取

通过 TCMSP 数据库(<https://tcmsp-e.com/tcm-sp.php>),以“甘遂”“甘草”为关键词检索其活性成分和作用靶点,设置口服利用生物度 $OB \geq 30\%$ 、类药性 $DL \geq 0.18$ 为筛选条件。将获得的作用靶点在 UniProt 蛋白数据库(<https://www.uniprot.org>)进行 ID 标准化命名,“Homo sapiens”为物种筛选条件。同时,把 TCMSP 数据库检索得到的活性成分输入 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)检索对应的 SMILES 结构,将对应 SMILES 结构依次输入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://swisstargetprediction.ch>)进行靶点基因预测,设定物种为“Homo sapiens”,选择置信度阈值(Probability) ≥ 0.3 靶点作为较可靠性的靶点。然后与 TCMSP 数据库收集的靶点合并,删除重复项得出药物的潜在作用靶点。

1.4.2 MA 靶点的获取以及与 KR-GRR 药对核心靶点映射

以“Malignant ascites”为关键词,通过 GeneCards(<https://www.genecards.org>)、DrugBank(<https://go.drugbank.com>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org>)、PharmGKB(<https://www.pharmgkb.org>)和 OMIM(<https://www.omim.org>)5 个数据库查询 MA 相关靶点,去重后获得与 MA 相关的最终靶点。

采用 Venny 2.1.0 线上程序(<http://bioinfogp.cnb.csic.es>)进行 KR-GRR 药对活性成分靶点与 MA 疾病靶点交集的获取,同时将共同靶点绘制成相应的韦恩图。

1.4.3 构建药对-活性成分-MA-靶点网络构建

把 KR-GRR 中药名称以及查询到的活性成分、对应的靶点与 MA 的共同靶点输入 Excel 表。将数据表格导入 Cytoscape 3.10.0 软件构建网络文件,应用插件 CytoNCA 进行拓扑分析,选择节点度(degree)为指标,对 KR-GRR 药对核心活性成分和靶点由高到低依次排序,并观察相互之间的关系。

1.4.4 核心靶点蛋白相互作用网络构建

为阐明 KR-GRR 药对与 MA 相关靶点的相互关系,将共同靶点输入 STRING 数据库(<https://string-db.org>)构建蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图,设定物种为“Homo sapiens”,隐藏网络中断开连接的节点,其余参数保持默认值,然后将网络图输出为 TSV 文件。采用 Cytoscape 3.10.0 软件借助内置工具 CytoNCA 对网络进行拓扑分析,根据度中心性(degree centrality, DC)、特征向量中心性(eigenvector centrality, EC)、局部边连通性(local average connectivity-based method, LAC)、中介中心性(betweenness centrality, BC)、紧密中心性(closeness centrality, CC)和网络中心性(Network centrality, NC)6 个指标进行筛选,对所选择的指标大于中位数的基因进行进一步分析,以此获得关键靶点。

1.4.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

将 KR-GRR 药对治疗 MA 的核心靶点导入 Metascape 平台(<https://www.metascape.org>),进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析。GO 功能包含生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组成(cellular component, CC)3 个部分,设置最小基因富集数量为 3,阈值 $P < 0.01$,富集因子 > 1.5 。通过微生信在线平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>),选用三合一柱状图展示 GO 条目,以气泡图的形式展示 KEGG 信号通路富集分析情况。

1.5 分子对接验证

选取核心靶点与其对应的活性成分进行分子对接。在 PubChem 中下载活性成分分子结构,借助 ChemBio3D Ultra 21.0.0.28 进行能量最小化,在 PDB 数据库中获得核心靶点蛋白结构,应用 Pymol 2.3.0 对核心靶点基因去除蛋白结晶水、原始配体等。然后使用 AutoDock Tools(v1.5.6)对活性成分和基因蛋白进行前处理,采用 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接,最后利用 PyMOL 2.3.0 和 discovery studio 对接结果进行相互作用模式分析。

1.6 动物实验

1.6.1 动物造模和分组给药

采用 H22 肝癌细胞构建 MA 模型。取稀释后活细胞数 >95% 的单细胞悬液,取 3 只 SPF 级 Balb/c 小鼠,消毒,每只小鼠在右侧腹部注射 0.2 mL 浓度为 1×10^7 /mL(相当于 2×10^6 /只)的细胞悬液。接种第 8 d,采用颈椎脱臼法处死,抽取乳白色腹水,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,保留细胞沉淀,使用 PBS 洗涤细胞,重复 2 次后重悬细胞,调整细胞浓度,再次进行体内细胞传代,连续 2 次。取 60 只同品系小鼠随机分为对照组(control, Con) 10 只和造模组 50 只,造模组接种方法与剂量同前,接种过程于 30 min 内完成。观察 3~5 日,小鼠腹部明显膨隆且经超声检查发现不规则液性暗区即可判断 MA 小鼠模型构建成功。

将造模组小鼠按照体重随机分为模型(model, Mod)组、恩度(endostar, End)阳性对照组、KR-GRR 低剂量(low-dose KR-GRR, KR-GRR-L)组、中剂量(medium-dose KR-GRR, KR-GRR-M)组、高剂量(high-dose KR-GRR, KR-GRR-H)组,每组 10 只。KR-GRR 用量参考《经方学用基本功》^[4]记载的甘遂半夏汤中两者的临床配伍比例制定,即按照 1:1 称取甘遂、甘草各为 5 g。根据小鼠与人体体表面积相对比值折算动物用量,小鼠等效剂量为人用量的 12.5 倍。KR-GRR-H 组给药剂量为 2.5 g/kg, KR-GRR-M 组给药剂量为 1.25 g/kg, KR-GRR-L 组给药剂量为 0.625 g/kg。End 组给药剂量为 3 mg/kg。Con 和 Mod 组给予等剂量蒸馏水,体积 10 mL/kg,每天 1 次,连续 7 d。

1.6.2 一般情况观察

每日观察小鼠一般状态和死亡情况,造模当天与开始给药后每隔 3 d 记录小鼠体重和腹围/体重比值变化。

1.6.3 腹水量

末次给药结束后,禁食不禁水 12 h,颈椎脱臼法处死后取材,注射器抽取腹水,测量腹水体积,收集进行下一步检测。

1.6.4 HE 染色观察腹膜组织病理学变化

抽取腹水后,剪开腹部,选小鼠左侧同一部位进行腹膜组织取材,尽量避开右侧腹腔注射部位,用 10% 甲醛溶液固定组织,经乙醇脱水,修剪,常规石蜡包埋,切片,HE 染色后置于光镜下观察,并根据细胞增生、纤维组织增生、炎细胞浸润和血管生成 4

方面,按照五级评分法:正常范围 0 分;轻微 1 分;轻度 2 分;中度 3 分;重度 4 分进行评分,评分之和即为病理评分^[5]。

1.6.5 ELISA 检测腹水 AKT1 和 MMP9 的表达

对照组小鼠采用生理盐水腹腔灌洗获得腹腔液体,具体操作如下:腹腔注射 5 mL 9% 无菌生理盐水,轻柔腹部,使生理盐水于腹腔表面脏器充分接触,再回抽并保存至 2 mL 离心管中。取各组小鼠腹水,用高速冷冻离心机 3 000 r/min,离心 10 min,取上清液,-80 ℃ 冰箱冻存。参照试剂盒说明书检测 AKT1 和 MMP9 的表达,所有试剂和样本均在室温平衡 30 min,设置标准品孔和样本孔,每个标准品浓度点设置复孔,每组样本设置生物学重复,加样,加酶,37 ℃ 恒温箱温育 60 min,弃液洗板,显色,最后加终止液终止反应,在 450 nm 下读取各孔 OD 值,AKT1 标准曲线为 $y = -0.1317x^2 + 15.074x - 0.5109$, $R^2 = 0.9997$,MMP9 标准曲线为 $y = 17.533x^2 + 33.515x - 0.8161$, $R^2 = 0.9993$,由此计算每组样品 AKT1 和 MMP9 的实际浓度。

1.6.6 RT-qPCR 检测腹膜组织 AKT1、TNF、TP53、IL-6、IL-1β、MMP9 的 mRNA 表达水平

取 50 mg 腹膜组织置于冰上剪碎,使用 Trizol 法提取 RNA,并检测 RNA 的浓度和纯度,采用一步法进行逆转录反应,反应条件 42 ℃/15 min,85 ℃/5 s。采用两步法 PCR 扩增程序进行检测,反应条件为预变性 94 ℃/120 s;循环反应 45 次,94 ℃/5 s,60 ℃/30 s。以 GAPDH 为内参校正,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达水平。目的基因引物序列由武汉合测基因科技有限公司合成(见表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	序列 Sequence	长度 Length (bp)
<i>GAPDH</i>	F: TGCCCCCATGTTTGTGATG R: TGTGCTCATGAGCCCTTCC	151
<i>AKT1</i>	F: GGA CTA CTTGCACTCCGAGAAG R: CATA GTG GCA CCGTCTTGATC	136
<i>TNF</i>	F: GCTGAGGTCAATCTGCCCAA R: GGGGCTCTGAGGAGTAGACA	162
<i>TP53</i>	F: TAGGGGGCACTAGCATTCA R: AGTCTTCGGAGAAGCGTGAC	70
<i>IL-6</i>	F: GGCTAAGGACCAAGACCATCC R: GCACTAGGTTTGCCGAGTAGA	89
<i>IL-1β</i>	F: CAAATCTCGCAGCAGCACATC R: TGTCTCTATCCTGGAAGGTC	118
<i>MMP9</i>	F: TTCACCGGCTAAACCACCTC R: TAACGCCCAGTAGAGGCCT	270

1.6.7 Western blot 检测腹膜组织 PI3K/AKT1/MMP9 信号通路相关蛋白表达的表达水平

剪取 50 mg 腹膜组织,低温研磨,加入 RIPA 法裂解提取蛋白,经 BCA 法检测蛋白样品浓度。制备 10% SDS-PAGE 凝胶,加样,电泳,转膜。5%的脱脂牛奶封闭 30 min,加入抗体 PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、p-AKT1(1:1 000)、AKT1(1:5 000)、MMP9(1:1 000)、GAPDH(1:5 000),4 ℃ 孵育过夜。用 TBST 在室温下的脱色摇床上洗 3 次,每次 5 min,接着加入对应属种的二抗(1:5 000),并在室温下孵育 30 min。滴加 ECL 发光液显影,放入曝光仪,选取曝光恰当的图像编号存档,Alpha 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 25.0 统计软件进行统计分析,结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据符合正态分布及方差齐性,采用 LSD 检验进行两两比较,方差不齐则选用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism10. 1. 2 软件

作图。

2 结果

2.1 KR-GRR 药对活性成分及作用靶点筛选结果

KR-GRR 药对去除重复活性成分后,得到主要活性成分 100 个,其中甘遂 8 个,甘草 92 个。通过 TCMS 数据库筛选药效成分靶蛋白,并将其输入 UniProt 数据库,得到靶点基因 186 个;在 PubChem 数据库中检索 TCMS 数据库筛选到的药效成分 SMILES 结构,并输入到 SwissTargetPrediction 中得到靶点基因 294 个;将两种方法检索到的靶点基因取交集后删除重复项,共得到 279 个药物成分靶点。

2.2 MA 相关靶点及 KR-GRR 药对与 MA 共同靶点的筛选

通过 GeneCards、DrugBank、DisGeNET、PharmGKB、OMIM 数据库查询得到 MA 相关靶点基因,分别为 285、6、86、7、66 个,合并数据去除重复项得到 408 个靶点基因。通过 Venny 2. 1. 0 绘制 279 个 KR-GRR 药对活性成分靶点与 408 个 MA 疾病靶点韦恩图,得出两者共同靶点为 51 个(见图 1)。

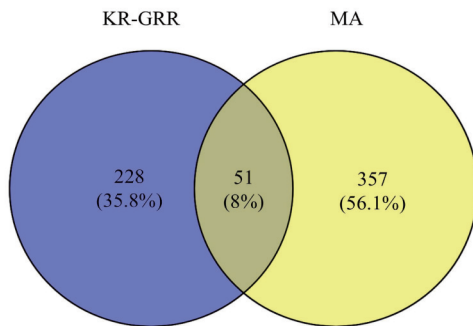


图 1 KR-GRR 药对与 MA 交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of common targets between compounds of KR-GRR drug pair and MA

2.3 构建 KR-GRR 药对-活性成分-MA-作用靶点调控网络

将 KR-GRR 药对的核心活性成分,以及对应靶点与 MA 的共同靶点导入 Cytoscape 3. 10. 0 软件,明确了本药对治疗 MA 的潜在活性成分共 13 个(见表 2)。并以此来构建“药对-活性成分-疾病-靶点”网络图(见图 2)。图中左侧绿色圆形代表药对与 MA 共同靶点对应的活性成分,紫色代表药对。右侧蓝色圆形代表药对与 MA 的共同靶点,紫色代表疾病。网络中按度值排名前 4 位的活性成分是槲皮素、山柰酚、千金子素、芒柄花素,度值分别是 24、10、8、7。由此推测上述 4 个活性成分可能是 KR-GRR 药对治疗 MA 的关键物质成分。

2.4 蛋白相互作用网络及其拓扑分析

通过 STRING 数据库获得 KR-GRR 药对治疗 MA 靶点 PPI 网络(见图 3 和图 4A)。本网络包含 51 个蛋白质节点、587 条边、平均节点度 23、预期延迟 160、平均局部聚类系数 0. 757。利用插件 CytoNCA 进行拓扑分析,根据有效成分 DC、EC、LAC、BC、CC 和 NC 6 个指标的中位数进行筛选,值越高提示该成分发挥主要功能的可能越大。经过筛选得出 6 个核心靶点,分别为 AKT1、TNF、IL-6、TP53、IL-1 β 、MMP9(见图 4B)。

2.5 GO 和 KEGG 通路富集分析结果

本研究通过 Metascape 数据库对 51 个共有靶点进行 GO 与 KEGG 富集分析,获得显著富集的 997 个

表 2 KR-GRR 药对治疗 MA 的潜在活性成分

Table 2 Potential active components of KR-GRR herb pair for treating MA

来源 Source	编号 Number	化学成分 Chemical component	OB(%)	DL
KR	MOL002587	千金子素 Euphorbetin	35.89	0.54
GRR	MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
	MOL000422	山柰酚 Kaempferol	41.88	0.24
	MOL000392	芒柄花素 Formononetin	69.67	0.21
	MOL000497	甘草查尔酮 A Licochalcone A	40.79	0.29
	MOL004961	槲皮素-3,3'-二甲醚 Quercetin 3,3'-dimethyl ether	46.45	0.33
	MOL004945	异补骨脂二氢黄酮 Isobavachin	36.57	0.32
	MOL004328	柚皮素 Naringenin	59.29	0.21
	MOL002311	甘草酚 Glycyrol	90.78	0.67
	MOL004941	4',7-二羟基黄酮 (2 <i>R</i>)-7-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	71.12	0.18
	MOL004835	刺果甘草查耳酮 Glypallichalcone	90.78	0.67
	MOL004910	光甘草宁 Glabranin	52.9	0.31
	MOL001792	甘草素 Liquiritigenin	32.76	0.18

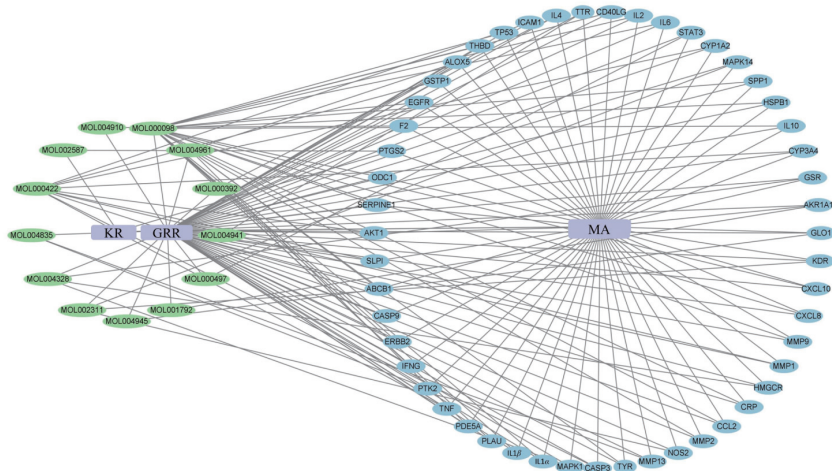


图 2 KR-GRR 药对治疗 MA 的药物-成分-靶点网络图

Fig. 2 Drug-compounds-target network of KR-GRR herb pair for MA treatment

GO 条目,分别是 BP 920 个、MF 57 个、CC 20 个和 KEGG 141 个。借助微生信在线平台分别展示排名前 10 的 GO 条目,用气泡图展示前 20 条 KEGG 通路富集分析情况。GO 分析结果显示,BP 主要涉及细胞迁移的积极调节、对脂多糖的反应、细胞活化、调节细胞间粘附、细胞群增殖、对辐射的反应、对外部刺激反应的负调节、血管生成的调节、对生长因子的反应和凋亡信号通路的负调节。CC 主要涉及囊泡腔、质膜外侧、细胞外基质、细胞质的核周区域、膜

筏、黏着、内质网腔、内肽酶复合物和纺锤。MF 主要涉及细胞因子活性、氧化还原酶活性、激酶调节活性、蛋白激酶活性、整合素结合、磷酸酶结合、丝氨酸型内肽酶活性、趋化因子活性、肿瘤坏死因子受体超家族结合和 NADP 结合(见图 5A)。KEGG 信号通路富集分析显示,KR-GRR 药对治疗 MA 主要影响的信号通路涉及癌症的通路、IL-17 信号通路、癌症中的蛋白聚糖、MAPK 信号通路、T 细胞受体信号通路、癌症中的微核糖核酸等(见图 5B)。

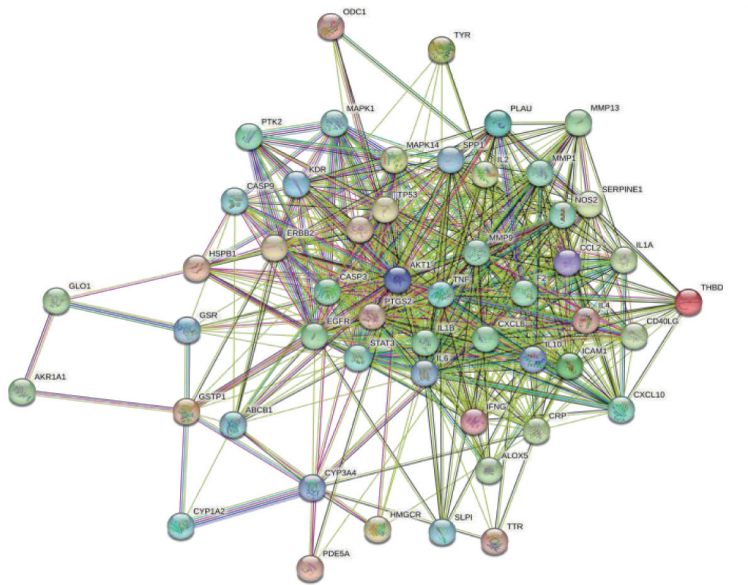


图3 KR-GRR 药对治疗 MA 的靶点 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram of targets for KR-GRR herb pair against MA

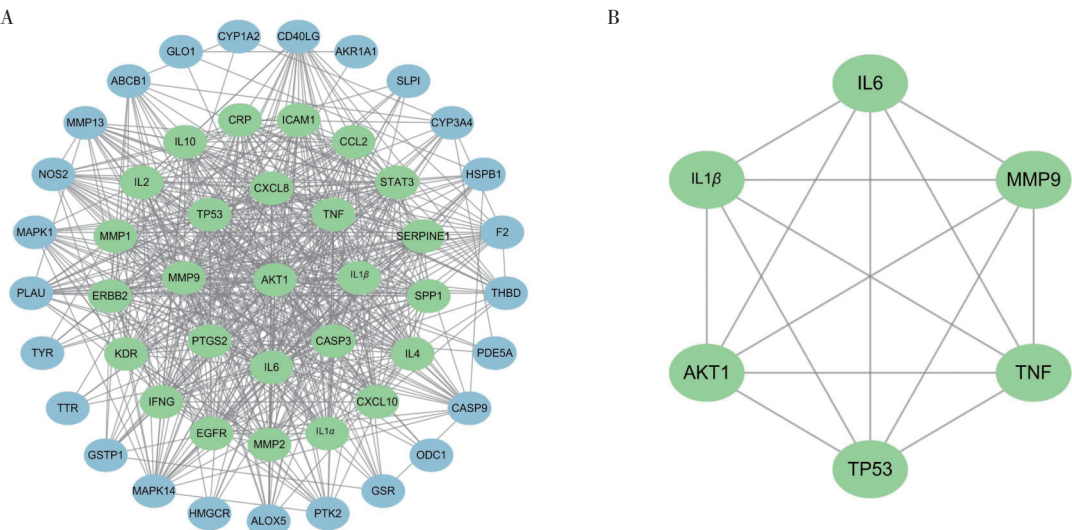


图4 KR-GRR 药对治疗 MA 的 PPI(A)与核心靶点(B)拓扑网络图

Fig. 4 Topological network of the PPI (A) and core target (B) for KR-GRR herb pair against MA

2.6 分子对接结果分析

首先,根据 PPI 网络图分析得出排名前 6 的核心靶点 (AKT1、TNF、IL-6、TP53、IL-1β、MMP9),然后将这 6 个靶点与其直接相连的成分进行分子对接,即山柰酚-AKT1、山柰酚-TNF、槲皮素-MMP9、槲皮素-IL-6、槲皮素-TP53、槲皮素-IL-1β(见表 3),潜在结合能均 < -5.0 kcal/mol,由此初步判断此药对的主要活性物质与 MA 受体蛋白对接良好,其中,结合能最小的两组“活性成分-基因靶点蛋白”为槲皮素-MMP9、山柰酚-AKT1,提示其可能是 KR-GRR 药对

治疗 MA 发挥关键作用的活性成分与作用靶点,两组“活性成分-基因靶点蛋白”的分子对接模型图(见图 6)。因此,本研究选择了 AKT1 和 MMP9 蛋白靶点介导的信号通路进行后续动物实验验证。

2.7 动物实验结果

2.7.1 KR-GRR 药对对小鼠一般情况的影响

小鼠在接种 H22 肝癌细胞第 5 d 开始出现腹水,并持续增加。第 6 d 开始治疗。末次给药结束后,Mod 组小鼠活动减少、被毛凌乱、腹部膨大,共死亡 2 只;经 KR-GRR 各剂量干预后的小鼠活动相对

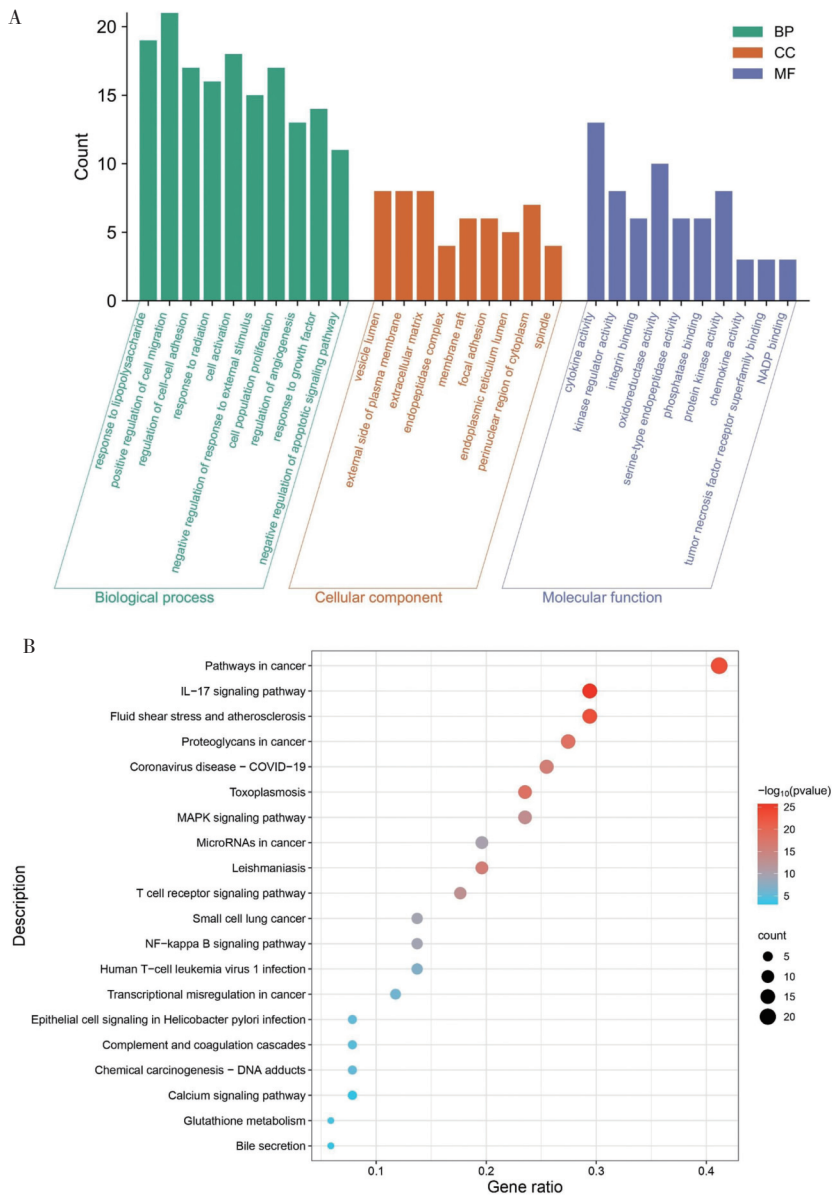


图 5 KR-GRR 药对治疗 MA 交集靶点的 GO 富集分析 (A) 和 KEGG 富集分析 (B)

Fig. 5 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis of comment targets for KR-GRR herb pair against MA

表 3 KR-GRR 药对主要活性成分与关键靶点对接结果

Table 3 Molecular docking results between the main active component of KR-GRR and key targets

活性成分 Active compound	靶点 Target	结合能 Binding energy(kcal/mol)
山柰酚 Kaempferol	AKT1	-9.3
	TNF	-5.9
槲皮素 Quercetin	MMP9	-9.7
	IL-6	-6.6
	TP53	-7.6
	IL-1β	-7.3

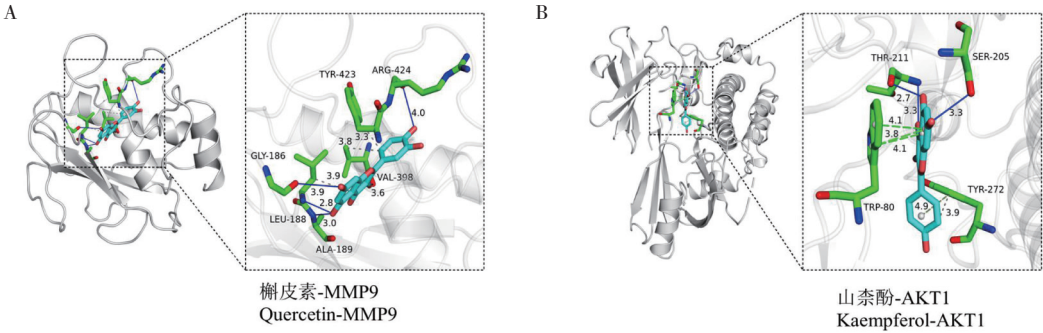


图6 KR-GRR 药对与核心靶点的分子对接模式

Fig. 6 Molecular docking pattern of KR-GRR herb pair with key targets

活跃,腹部膨隆程度减轻,无死亡。造模当天(0 d)和第6 d 各组小鼠体重差异无统计学意义。第9 d,与 Con 组相比,Mod 组体重升高($P < 0.05$);与 Mod 组比较,给药组差异无统计学意义。给药第12 d,与

Con 组比较,Mod 组体重显著升高($P < 0.01$);与 Mod 组比较,End 组与 KR-GRR-H 组体重增长趋势平稳缓慢,且显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)(见图7)。

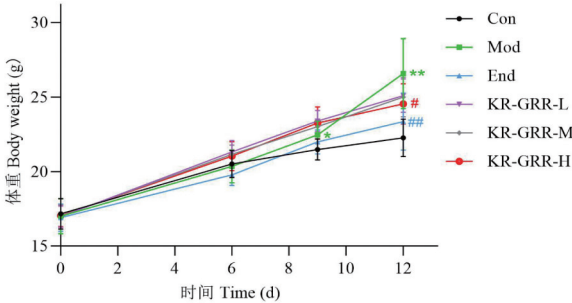


图7 KR-GRR 药对对小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$)

Fig. 7 Effects of KR-GRR herb pair on body weight in mice($\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$)

注:与 Con 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 Mod 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$,下同。Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with Mod group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, the same below.

2.7.2 KR-GRR 药对对小鼠腹围/体重比值的影响
造模当天和第6、9 d 各组小鼠腹围/体重比值差异无统计学意义。第12 d,与 Con 组比较,Mod 组

腹围/体重比值显著升高($P < 0.01$),与 Mod 组比较,End 和 KR-GRR-H 组腹围/体重比值降低($P < 0.05$)(见图8)。

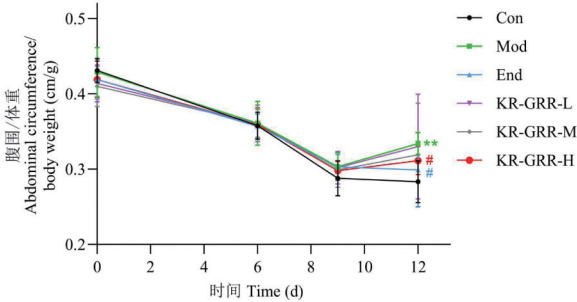


图8 KR-GRR 药对对小鼠腹围/体重比值的影响($\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$)

Fig. 8 Effects of KR-GRR herb pair on the abdominal circumference/body weight ratio in mice($\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$)

2.7.3 KR-GRR 药对对小鼠腹水量的影响
与 Mod 组比较,End 和 KR-GRR-H 组腹水量显

著降低($P < 0.01, P < 0.05$), KR-GRR-L 与 KR-GRR-M 组有下降趋势,但差异无统计学意义(见图9)。

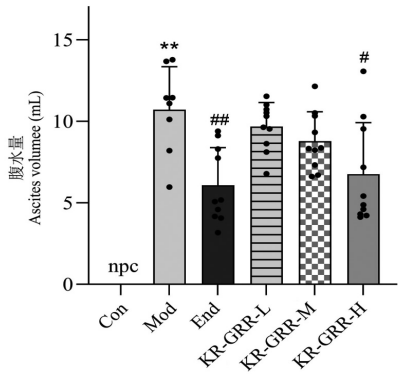


图9 KR-GRR 药对对小鼠腹水量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$)

Fig. 9 Effect of KR-GRR herb pair on ascites volume in mice($\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$)

注:npc表示未见病理改变,下同。Note:npc indicated no pathological change,the same below

2.7.4 KR-GRR 药对对小鼠腹膜组织病理及评分的影响

小鼠送检样本按照分层随机抽样法(下同),每组选择6只进行病理检测。Con组小鼠腹膜组织主要由单层扁平的间皮细胞和薄层疏松结缔组织构成,结缔组织内胶原纤维排列稀疏,细胞成分较少,未见明显的纤维组织增生或炎细胞浸润。与Con组比较,Mod组小鼠腹膜表面可见细胞增生,呈钉子状,亦可见纤维组织增生,主要以长椭圆形成纤维细胞和长梭形纤维细胞增生为主,新生的毛细血管形成明显;与Mod组比较,KR-GRR干预后小鼠腹膜细胞形态、纤维组织增生和新生毛细血管数量有不同程度的改善,其中KR-GRR-H组的疗效最佳(见图10、11)。

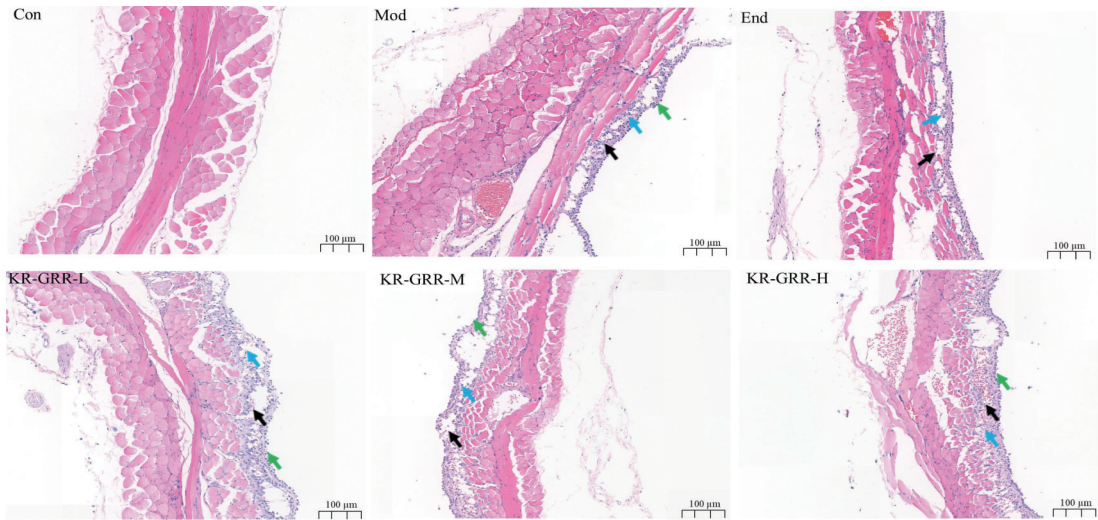


图10 KR-GRR 药对对小鼠腹膜组织病理结构的影响(HE染色, $\times 100$)

Fig. 10 Effect of KR-GRR herb pair on the histopathological structure of the peritoneum in mice(HE staining, $\times 100$)

注:绿色箭头表示细胞增生;蓝色箭头表示纤维组织增生;黑色箭头表示新生毛细血管形成。Note:Green arrow indicates cell proliferation; Blue arrow indicates fibrous tissue hyperplasia;Black arrow indicates neovascularization.

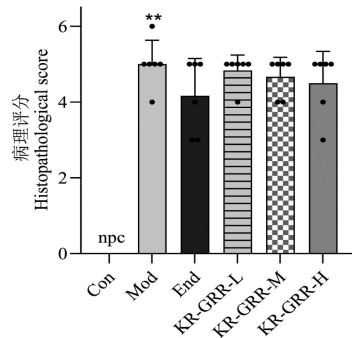


图11 KR-GRR 药对对MA小鼠腹膜病理形态评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 Effect of KR-GRR herb pair on the histopathological score of the peritoneum in MA mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.7.5 KR-GRR 药对对小鼠腹水 AKT1 和 MMP9 含量的影响

与Con组比较,Mod组小鼠腹水中AKT1和MMP9表达显著增加($P < 0.05, P < 0.01$);与Mod组比较,KR-GRR-H组小鼠腹水中AKT1和MMP9表达显著降低($P < 0.05$),KR-GRR-M和KR-GRR-L组表达有降低趋势,但差异无统计学意义(见图12)。综上,根据药效学结果,后续实验采用高剂量组样本进行KR-GRR药对干预MA的机制验证研究。

2.7.6 KR-GRR 药对对小鼠腹膜组织 AKT1、TNF、IL-6、TP53、IL-1 β 、MMP9 mRNA 表达的影响

与Con组比较,Mod组小鼠腹膜组织AKT1、TNF、

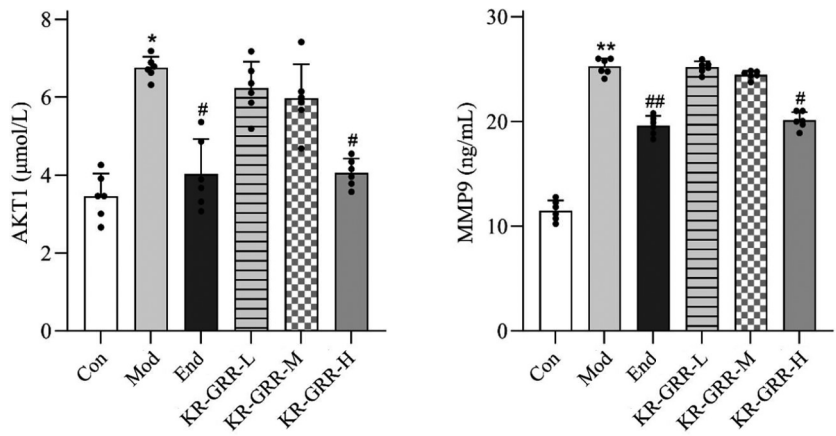


图 12 KR-GRR 药对对小鼠腹水 AKT1 和 MMP9 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$)

Fig. 12 Effects of KR-GRR herb pair on the expression of AKT1 and MMP9 in mice ascites($\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$)

IL-6、*TP53*、*IL-1β*、*MMP9* mRNA 表达显著增高 ($P < 0.01$) ; 与 Mod 组比较, KR-GRR-H 组干预后小鼠腹

膜组织 *AKT1*、*TNF*、*IL-6*、*TP53*、*IL-1β*、*MMP9* mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$) (见图 13)。

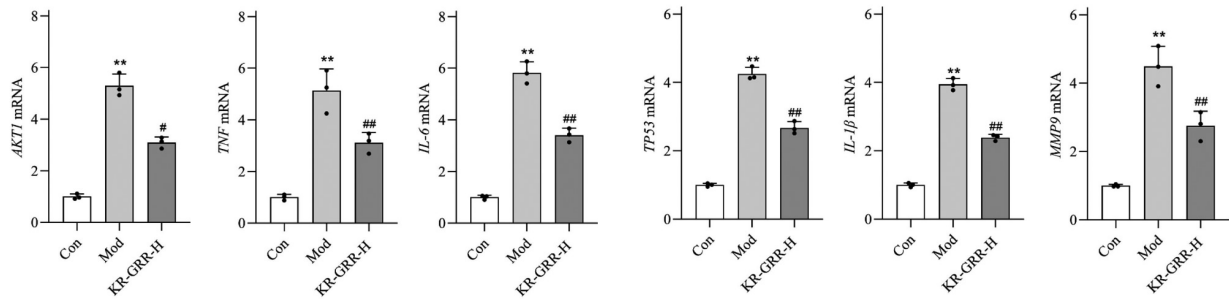


图 13 KR-GRR 药对对小鼠腹膜组织 *AKT1*、*TNF*、*IL-6*、*TP53*、*IL-1β*、*MMP9* mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effects of KR-GRR herb pair on the mRNA expression of *AKT1*, *TNF*, *IL-6*, *TP53*, *IL-1β*, and *MMP9* in mice peritoneal tissue($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7.7.7 KR-GRR 药对对小鼠腹膜组织 PI3K/AKT1/MMP9 信号通路相关蛋白表达的影响

与 Con 组比较, Mod 组小鼠腹膜组织 PI3K、p-PI3K、AKT1、p-AKT1、MMP9 蛋白相对表达量及 p-PI3K/PI3K、p-AKT1/AKT1 比值显著升高 ($P < 0.01$) ; 与 Mod 组比较, KR-GRR-H 组干预后腹膜组织 PI3K、p-PI3K、AKT1、p-AKT1、MMP9 蛋白相对表达量和 p-PI3K/PI3K、p-AKT1/AKT1 比值显著降低 ($P < 0.01$) , 由此可见, KR-GRR 通过调节 PI3K/AKT1/MMP9 信号通路干预 MA (见图 14)。

3 讨论与结论

MA 发病机制与肿瘤腹膜转移引起血管通透性增加以及腹水中的炎症因子和趋化因子有关^[6,7]。因此, 开发具有抗肿瘤、抗炎和抗血管生成多重作用的药物对 MA 治疗具有重要意义。中医药治疗 MA 具有整体调节、多靶点和多途径的独特优势。KR-

GRR 药对载于张仲景《金匱要略》甘遂半夏汤, 具有泄水逐饮, 补虚扶正之功效。现代研究证实该药对可调节体内水液代谢, 对浆膜腔积液疗效显著^[8], 可作为临床二线或联合治疗药物。自古以来, 传统汤剂是中药发挥临床疗效的有效载体, 随着中医药现代化的发展, 具有标准化和质量均一性的中药配方颗粒已广泛应用于临床, 成为和传统汤剂同样重要的有效剂型。相关研究表明, 中药汤剂与现代配方颗粒具有相同的药效作用^[9], 因此, 本研究使用 KR-GRR 药对配方颗粒开展治疗 MA 的药效物质与作用机制研究。

本研究通过网络药理学筛选出槲皮素、山柰酚、千金子素、芒柄花素等 13 个 KR-GRR 药对治疗 MA 的潜在活性成分。槲皮素通过下调 HSP90/70 表达促进腹水中癌细胞凋亡; 同时可以降低 VEGF 的表达减少血管生成^[10], 其氧化特性还能抑制炎症介

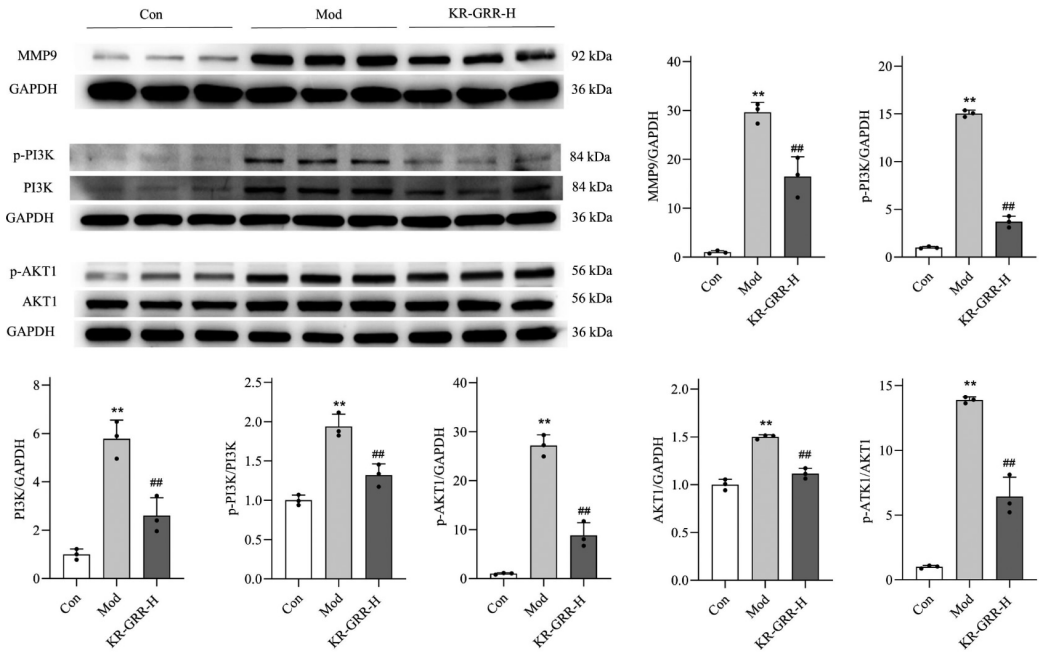


图 14 KR-GRR 药对小鼠腹膜组织 PI3K/AKT1/MMP9 信号通路相关蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 14 Effect of KR-GRR herb pair on the protein expression levels of the PI3K/AKT1/MMP9 signaling pathway in mice peritoneal tissue($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质,阻断 AKT 的磷酸化^[11];山柰酚可通过耗竭谷胱甘肽促进肿瘤细胞凋亡^[12];千金子素通过激活 caspase 信号通路和自噬选择性发挥抗癌作用^[13];芒柄花素调控细胞周期蛋白,抑制体内 AKT 相关多条促肿瘤生成信号通路^[14]。本研究建立了 H22 肝癌细胞诱导的 MA 模型,探究 KR-GRR 药对对该模型的干预作用。药效学结果表明,KR-GRR 药对可降低 MA 小鼠腹围/体重比值和腹水量,一定程度上缓解腹膜组织肿瘤细胞增生、成纤维细胞增生和新生血管形成。由此证明,KR-GRR 药对能有效缓解 MA 症状。

通过靶点预测与筛选,我们获得 KR-GRR 药对治疗 MA 的核心靶点是 AKT1、TNF、IL-6、TP53、IL-1 β 和 MMP9,主要功能涉及肿瘤细胞增殖、侵袭、转移和凋亡,炎症反应和血管生成等过程。其中 AKT1 诱导腹水中肿瘤细胞的扩散表型、增强运动性、细胞外基质成分的粘附和血管生成^[15];TNF、IL-6 和 IL-1 β 介导肿瘤微环境中的炎症级联反应^[16,17];Tp53 调控腹水中肿瘤细胞周期停滞和细胞死亡^[18];MMP9 诱导内皮细胞运动,促进肿瘤细胞侵袭、转移和血管形成^[19]。为进一步验证 KR-GRR 药对药效物质与 MA 核心靶点的相互关系,通过分子对接技术证实,槲皮素和山柰酚等活性成分可以

很好的对接至 AKT1、TNF、IL-6、TP53、IL-1 β 、MMP9 等核心靶点。

通过 GO 富集分析结果发现,涉及的生物过程均体现在药对有效成分的发挥及靶点所涉及的通路中。KEGG 通路富集分析预测了 KR-GRR 药对治疗 MA 可能作用的信号通路是癌症信号通路。结合分子对接可视化结果,笔者推测 AKT1 靶点介导的 PI3K/AKT1/MMP9 信号通路在 KR-GRR 药对活性成分改善 MA 作用中发挥了核心作用。MA 炎症微环境中富集 TNF 和 IL-6 等多种细胞因子,可以激活 PI3K/AKT 信号通路,使肿瘤细胞侵袭、转移能力增加,进而产生新的恶性积液,形成恶性循环^[20]。MMP9 是 PI3K/AKT 信号通路下游的重要效应靶点。本研究结果表明,经过 KR-GRR 干预后,腹水中 AKT1 和 MMP9 表达水平显著降低,腹膜组织中 AKT1、TNF、IL-6、TP53、IL-1 β 、MMP9 mRNA 表达水平和 PI3K、p-PI3K、AKT1、p-AKT1、MMP9 蛋白相对表达量及 p-PI3K/PI3K、p-AKT1/AKT1 比值显著降低。由此证明,KR-GRR 药对可能通过抑制 PI3K/AKT1/MMP9 癌症信号通路,发挥对 MA 小鼠的保护作用。

综上所述,KR-GRR 药对通过干预 PI3K/AKT1/MMP9 信号通路发挥治疗 MA 的作用,后续研究将

构建卵巢癌、结肠癌和胃癌等多种肿瘤来源的 MA 动物模型,系统开展 KR-GRR 药对在不同模型中的药效作用并阐明其分子机制研究,为临床应用提供更全面的实验依据。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.000cv>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Wang YQ, Sun YT, Li XY, et al. Progress in the treatment of malignant ascites [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2024, 194: 104237.
- 2 Huo M, Li N, Li MY et al. Diuretic effect and impact on RAAS system of the ascites model rats by Gansui Banxia Decoction with or without Kansui Radix-Licorice incompatible combination [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2022, 37: 3445-3452.
- 3 Wang R, Wang TT, Hao L, et al. Regulatory effect of the AQP2/ADRB1/PIK3CG/AVPR2 pathway in rats with cancer ascites by compatibility of Radix Euphorbiae Kansui and Radix Glycyrrhizae [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2022, 37: 1096-1101.
- 4 Wang F. Basic Skills in the Study and Application of Ancient Prescriptions (经方学用基本功) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012, 279.
- 5 Zhang HM, Yao DL, et al. Pathological Diagnosis of Drug Toxicity (药物毒性诊断病理学) [M]. Beijing: Science Press, 2021.
- 6 Lane D, Matte I, Rancourt C, et al. Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients [J]. BMC Cancer, 2011, 11: 210-216.
- 7 Ito T, Hanafusa N, Iwase S, et al. Ascitic IL-10 concentration predicts prognosis of patients undergoing cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy [J]. Ther Apher Dial, 2020, 24: 90-95.
- 8 Wang Q, Zhong GS, Wang HL, et al. An Experimental study on the effect of Gansui Banxia Decoction with different proportions of Kansui Radix and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in malignant ascites rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 177-181.
- 9 Ding HX, Chen XR, Luo BJ, et al. Mechanisms of different dosage forms of Danggui Shaoyao powder in ameliorating scopolamine-induced cognitive impairment in mice [J/OL]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床): 1-14 [2025-10-21]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyy.20250701.002>.
- 10 Anand K, Asthana P, Kumar A, et al. Quercetin mediated reduction of angiogenic markers and chaperones in DLA-induced solid tumours [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12: 2829-2835.
- 11 Maurya AK, Vinayak M. Quercetin attenuates cell survival, inflammation, and angiogenesis via modulation of AKT signaling in murine t-cell lymphoma [J]. Nutr Cancer, 2017, 69: 470-480.
- 12 Radhika M, Ghoshal N, Chatterjee A. Comparison of effectiveness in antitumor activity between flavonoids and polyphenols of the methanolic extract of roots of *Potentilla fulgens* in breast cancer cells [J]. J Complement Integr Med, 2012, 9: 24.
- 13 Mesas C, Martínez R, Ortiz R, et al. Antitumor effect of the ethanolic extract from seeds of *Euphorbia lathyris* in colorectal cancer [J]. Nutrients, 2021, 13: 566-583.
- 14 Aliya S, Alhammadi M, Park U, et al. The potential role of formononetin in cancer treatment: an updated review [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 168: 115811.
- 15 Peart TM, Correa RJ, Valdes YR, et al. BMP signalling controls the malignant potential of ascites-derived human epithelial ovarian cancer spheroids via AKT kinase activation [J]. Clin Exp Metastasis, 2012, 29: 293-313.
- 16 Zhang B, Yan SK, Bao CL, et al. Research progress of natural products targeting tumor angiogenesis [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 510-520.
- 17 Voronov E, Apte RN. Targeting the tumor microenvironment by intervention in interleukin-1 biology [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23: 4893-4905.
- 18 Magalhães LF, Mello-Andrade F, Pires WC, et al. *cis*-[RuCl (BzCN) (bipy) (dppe)] PF6 induces anti-angiogenesis and apoptosis by a mechanism of caspase-dependent involving DNA damage, PARP activation, and Tp53 induction in ehrlich tumor cells [J]. Chem Biol Interact, 2017, 278: 101-113.
- 19 Belotti D, Paganoni P, Manenti L, et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation [J]. Cancer Res, 2003, 63: 5224-5229.
- 20 Yin T, Wang GP, He SS, et al. Malignant pleural effusion and ascites induce epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties via the vascular endothelial growth factor (VEGF)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway [J]. J Biol Chem, 2016, 291: 26750-26761.