

基于网络药理学和实验验证探究 17-羟-岩大戟内酯 B 通过 PI3K-Akt 信号通路介导线粒体凋亡途径诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用机制

邓思琦¹, 曾乐冰¹, 郭常怡¹, 孙宇², 洪瑜², 马天成¹, 刘琦², 马玉坤^{2*}

1. 齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

2. 齐齐哈尔医学院 医药科学研究院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: 目的 基于网络药理学探究 17-羟-岩大戟内酯 B (HJB) 对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用机制, 并进行实验验证。方法 采用网络药理学对 HJB 作用靶点进行筛选, 构建靶点网络及蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 对 HJB 抗肝癌潜在的作用靶点及相关通路进行预测。并用 0 (空白对照)、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 HJB 作用于 HepG2 细胞 24、48、72 h, 采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法检测各组细胞的增殖活性。以 0 (空白对照)、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 HJB 作用于 HepG2 细胞 48 h 后, 膜联蛋白 V (Annexin V) - 异硫氰酸荧光素 (FITC) / 碘化丙啶 (PI) 双染法检测各组细胞的凋亡, JC-1 染色法观察细胞的线粒体膜电位变化, DCFH-DA 染色法观察细胞的活性氧水平。Western blotting 法检测各组细胞线粒体凋亡及磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) - 蛋白激酶 B (Akt) 信号通路相关蛋白表达变化。结果 通过网络药理学预测, 得出 HJB 与肝癌有 291 个共同靶点; 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析结果显示 HJB 治疗肝癌结果主要在癌症通路、癌症中的蛋白多糖、血脂与动脉粥样硬化和 PI3K-Akt 信号通路等信号通路; HJB 时间和剂量相关性地显著抑制 HepG2 细胞增殖。与空白对照组相比, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ HJB 组细胞的活性氧水平、凋亡率、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C (Cyt C)、裂解胱天蛋白酶-9 (cleaved Caspase-9)、裂解胱天蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3) 蛋白水平呈浓度相关性升高 ($P < 0.05$), 线粒体膜电位、Bcl-2、磷酸化 PI3K (p-PI3K)、磷酸化 Akt (p-Akt) 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。结论 HJB 可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖, 促进 HepG2 细胞凋亡, 其机制可能与 PI3K-Akt 通路介导线粒体凋亡途径有关。

关键词: 17-羟-岩大戟内酯 B; 狼毒大戟; 肝癌; 网络药理学; PI3K-Akt 通路; 线粒体凋亡

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)12-3065-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.12.009

Mechanism of 17-hydroxy-rockcaprolactone B in inducing apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through the mitochondrial apoptosis pathway mediated by the PI3K-Akt pathway based on network pharmacology and experimental verification

DENG Siqi¹, ZENG Lebing¹, GUO Changyi¹, SUN Yu², HONG Yu², MA Tiancheng¹, LIU Qi², MA Yukun²

1. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

2. Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

Abstract: Objective To investigate the effects of 17-hydroxyjolkinalide B (HJB) on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells based on network pharmacology and to analyze the possible mechanisms. **Methods** Network pharmacology was used to screen the targets of HJB action, construct target networks and protein-protein interactions (PPI) networks, and predict the potential targets of HJB anti-hepatocellular carcinoma action and related pathways. HepG2 cells were treated with 0 (blank control), 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ of HJB for 24, 48 and 72 h, and the proliferative activities of the cells in each group were detected by CCK-8 assay. After HepG2 cells were treated with 0 (blank control), 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of HJB for 48 h, apoptosis of cells in each group was detected

收稿日期: 2024-09-07

基金项目: 黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目 (2023-KYYWF-0870); 黑龙江省卫生健康委科研项目 (20221313050620); 黑龙江省中医药管理局青年中医药科研课题 (ZYH2024-297)

作者简介: 邓思琦, 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物抗肿瘤机制方面的研究。E-mail: 17735745701@163.com

*通信作者: 马玉坤, 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事天然药物抗肿瘤研究方面的研究。E-mail: kuntengchongtian@163.com

by Annexin V-FITC/PI double staining, mitochondrial membrane potential changes of the cells were observed by JC-1 staining, and reactive oxygen species levels of the cells were observed by DCFH-DA staining. Western blot assay was performed to detect mitochondrial apoptosis of cells and the proliferative activity of cells in each group. Western blotting assay was used to detect the mitochondrial apoptosis and protein expression changes related to PI3K-Akt signaling pathway in each group. **Results** The network pharmacological prediction yielded 291 common targets between HJB and hepatocellular carcinoma; KEGG enrichment analysis showed that the results of HJB treatment for hepatocellular carcinoma were mainly in the signaling pathways of cancer pathway, proteoglycans in cancer, lipids and atherosclerosis, and PI3K-Akt signaling pathway and the time-dose related significant inhibition of HepG2 cell proliferation by HJB. Compared with the blank control group, after the action of HJB, the cellular reactive oxygen species level, apoptosis rate, Bax, Cyt C, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3 protein levels were increased in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$), and the mitochondria's membrane potential, Bcl-2, p-PI3K, and p-Akt protein expression were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** The study showed that HJB inhibited the value-added of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and promoted apoptosis of HepG2 cells, and the mechanism may be related to the PI3K-Akt pathway mediating the mitochondrial apoptotic pathway.

Key words: 17-hydroxy-hippocampal lactone B; lycopodium macrocarpon; liver cancer; network pharmacology; PI3K-Akt pathway; mitochondrial apoptosis

狼毒大戟属于大戟科多年生草本植物, 历史可追溯至《神农本草经》。在传统医学实践中, 狼毒大戟因其特殊的药理作用, 常被采用“以毒攻毒”的治疗策略, 用于对抗癌症、结核病以及腹水等严重疾病; 民间采用狼毒大戟根与大枣蒸食, 用于晚期癌症和癌症术后治疗, 也用于抗炎和驱虫等^[1]。本课题组前期从野生狼毒大戟根部提取分离出数种松香烷二萜类化合物(FDTs)^[2-4], 其中 17-羟-岩大戟内酯 B (HJB) 活性最强, 经多项肿瘤细胞和动物实验研究表明其对恶性肿瘤包括乳腺癌、肺癌和胃癌细胞均表现出显著的抑制活性, 其主要分子机制是抑制肿瘤细胞增殖周期、抑制肿瘤血管生成及诱导肿瘤细胞凋亡等^[5-7], 但是 HJB 对肝癌相关研究开展较少, 作用机制仍不明确。癌症是引起死亡的主要原因, 其中肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在临床肿瘤学中占有重要位置, 在中国肝癌的发病率和死亡率呈快速上升趋势, 并对公共卫生构成了日益严峻的挑战^[8]。因此, 开发高效低毒的抗肝癌药物已成为药物研发的重要方向。在新药研发过程中, 从中药资源中筛选具有抗肝癌作用的天然活性成分, 对于肝癌药物的研发具有重要意义^[9]。本研究基于网络药理学^[10-11]和实验探讨 HJB 对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用及其诱导凋亡的相关机制, 为狼毒大戟有效成分的抗肝癌新药研究提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人 HepG2 细胞购自中国科学院细胞库 (货号

SCSP-510)。

1.2 药物及试剂

HJB 由齐齐哈尔医学院医药科学研究院提取 (质量分数 > 98%); DMEM 培养液 (货号 CM15019) 购自北京中科迈晨科技有限公司; 特级胎牛血清 (货号 086-150) 购自南京维森特生物技术有限公司; 裂解胱天蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3) 抗体 (货号 9664)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 抗体 (货号 4223T)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体 (货号 2772)、细胞色素 C (Cyt C) 抗体 (货号 4280T)、蛋白激酶 B (Akt) 抗体 (货号 9272S)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 抗体 (货号 4249S)、磷酸化 PI3K (p-PI3K) 抗体 (货号 4228S)、磷酸化 Akt (p-Akt) 抗体 (货号 4060S) 均购自美国 CST 公司; 胰酶消化液 (货号 C0203)、青霉素-链霉素溶液 (货号 C0222)、细胞计数试剂盒-8 (货号 C0038) 均购于上海碧云天生物科技有限公司; JC-1 细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒 (货号 KGA1904)、膜联蛋白 V (Annexin V) - 异硫氰酸荧光素 (FITC) / 碘化丙啶 (PI) 双染细胞凋亡试剂盒 (货号 KGA1102)、BCA 蛋白测定试剂盒 (货号 KGPBCA)、活性氧检测试剂盒 (货号 KGT010-1) 均购于江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.3 主要仪器

LSM710 型激光扫描共聚焦显微镜购自德国 Zeiss 公司; EM208S 型电子显微镜购自荷兰飞利浦公司; 二氧化碳恒温培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; FACS Calibur 型流式细胞仪购自美

国BD公司;Power/PAC3000型电泳仪购自美国Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 HJB 药物靶点获取

通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PharmMapper 数据库 (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>), 预测出与 HJB 所对应的作用靶点, 并通过 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化处理。

2.2 肝癌疾病靶点获取

以“liver cancer”为基础搜索词条, 通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传资料库 (OMIM, <http://omim.org/>) 等对肝癌靶点进行筛选。将 HJB 靶点和肝癌靶点进行交集, 利用 Venny 平台进行分析, 获取 HJB 治疗肝癌的潜在靶点信息。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析与核心靶点获取

采用 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库分析在 2.2 项下得到的交集靶点数据, 使用该数据库中功能来探索 PPI 网络。将分析结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 利用其内置的“Network Analyzer”工具对蛋白质相互作用网络进行分析, 并利用其 Centiscape 2.2 插件来筛选核心靶点, 有助于找到在网络中具有重要影响力的蛋白质。通过这些分析和筛选步骤, 可以构建 PPI 网络图并识别出核心靶点。

2.4 基因本体 (GO) 功能富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

为了深入理解筛选出的核心靶点的生物学功能和它们在疾病中的潜在作用机制, 本研究采用了 Metascape 平台 (<https://www.metascape.org/>) 对在 2.3 项下筛选的核心靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 为了更直观地展示 KEGG 通路富集分析结果, 本研究利用微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 平台绘制 KEGG 通路富集的气泡图。

2.5 分子对接

从 PubChem 数据库中下载得到 HJB 的 3D 结构, 并导入 AutoDockTools 软件中进行预处理。同时, 通过 PDB 数据库检索相应的分子靶点, 完成之后利用 PyMOL 工具移除 PDB 文件中蛋白结构的配体及非蛋白成分。随后, 通过使用

AutoDockTools 软件对蛋白结构进行氢原子的添加和电荷的赋予, 之后对整体电荷进行计算。在分子对接流程结束后, 可采用 Pymol 软件进行可视化处理。

2.6 CCK-8 法检测细胞存活率

将细胞接种于含有 10% 胎牛血清的完全培养基中, 并在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养, 直至细胞进入对数生长期。使用胰蛋白酶对细胞进行消化, 然后重悬细胞, 将其稀释至 1.0×10⁴ 个/mL 的浓度。之后将 200 μL 的细胞悬液接种到 96 孔细胞培养板中, 并继续培养 24 h。根据相关文献报道^[5, 12], 采用 0、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L HJB 处理细胞, 处理时间分别为 24、48、72 h。处理结束后, 在各孔中添加 20 μL CCK-8 试剂, 随后将细胞培养板重新放置在 37 °C 的培养箱中, 孵育 2 h。孵育结束后, 利用酶标分析仪在 450 nm 的波长下测定吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{空白对照}} - A_{\text{空白对照}})$$

2.7 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡率

在细胞生长对数阶段, 以 5.0×10⁵ 个/mL 的细胞悬液浓度放至 6 孔细胞培养板中, 培养孵育 24 h。在此过程中, 将 0、5、10、20 μmol/L HJB 处理细胞 48 h 后, 收集、洗涤细胞, 加入提前制备好的 Annexin V-FITC、PI 染液吹打均匀, 在室温条件下, 将细胞悬液置于暗处孵育 30 min, 通过流式细胞仪检测, 定量分析细胞凋亡的比例, 从而评估不同浓度 HJB 对细胞凋亡的影响。

2.8 AO/EB 法观察细胞凋亡形态

依据 2.6 项下所描述的细胞分组策略, 对细胞进行相应的药物处理和培养。使用磷酸盐缓冲液对细胞进行 2 次洗涤, 参考 AO/EB 试剂盒操作说明书, 向 6 孔板中每个孔分别加入 AO、EB 染液各 5 μL, 在加入染液后, 将细胞培养板轻轻摇匀, 以确保染液与细胞充分接触。之后, 将培养板放置于 4 °C 的冰箱中, 在避光条件下孵育 15 min。采用共聚焦显微镜对各实验组细胞的凋亡特征进行详细的观察, 记录细胞形态的变化, 并通过拍摄获取细胞凋亡的显微照片。

2.9 DCFH-DA 法检测活性氧变化

按照 2.6 项下中细胞分组方法进行分组。按照活性氧检测试剂盒步骤进行操作, 首先对细胞进行洗涤, 洗涤结束后, 加入无血清稀释的探针, 将细胞与探针在 37 °C 的条件下孵育 20 min, 利用流式细胞仪对细胞内的活性氧含量进行定量检测。

2.10 JC-1 染色法检测线粒体膜电位变化

按照 2.6 项下细胞分组方法进行分组。在评估线粒体膜电位的变化时,依照 JC-1 试剂盒的步骤进行实验操作。首先,对细胞进行洗涤,洗涤步骤完成后,向细胞中添加稀释的 JC-1 染色液,之后在 37℃ 的条件下进行 20 min 孵育,孵育时间完成后,使用 1×Buffer 溶液对细胞进行洗涤,最后采用流式细胞仪对细胞样本的线粒体膜电位变化进行定量分析。

2.11 Western blotting 法检测线粒体凋亡途径和 PI3K-Akt 信号通路相关蛋白的表达

根据 2.6 项下细胞分组方法,对细胞进行药物处理。首先对各组细胞进行收集,并将其置于冰浴条件下的细胞裂解液中,持续 30 min 裂解细胞。随后,在低温条件下高速离心 20 min 提取细胞总蛋白。使用 BCA 法测定蛋白样品的浓度。接下来,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对适量变性后蛋白样品进行分离。电泳完成后,将蛋白质从凝胶转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上并使用脱脂奶粉对 PVDF 膜进行封闭处理,持续 2 h,以减少非特异性结合。然后使用三乙醇胺缓冲盐水(TBST)对 PVDF 膜进行 3 次洗涤。之后,将膜与稀释后的一抗在 4℃ 条件下孵育过夜。次日,再次使用 TBST 洗涤膜,然后加入二抗,在室温下孵育 2 h。孵育完成后,再次洗涤膜,使用 ECL 发光液进行显色反应。最后,利用 Bio-Rad ChemiDoc™ Touch Imaging System 对膜进行曝光,以捕获蛋白质条带的图像。使用 Image J V 1.8.0 图像分析软件对条带的灰度值进行测量,并通过比较各组间的灰度值差异,评估不同药物处理对细胞蛋白表达的影响。

2.12 统计学分析

本研究使用 SPSS 26.0 软件处理和分析收集到的数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,检验标准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 HJB 治疗肝癌潜在作用靶点

通过 PubChem、PharmMapper 数据库获得 476 个 HJB 的潜在靶点,通过 GeneCards、OMIM 数据库获得 11 962 个肝癌的相关靶点。将药物靶点与疾病靶点取交集,获得 291 个共有靶点,即 HJB 治疗肝癌的潜在作用靶点,见图 1。

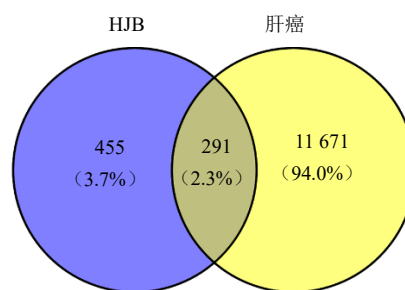


图 1 HJB 靶点与肝癌疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of HJB targets and liver cancer disease targets

3.2 PPI 网络分析和核心靶点获取

将 3.1 项下获得的共有靶点,通过数据库 STRING 分析,并通过 Cytoscape 软件可视化 PPI 网络,制作“成分-靶点-通路-疾病”网络,见图 2。通过 Cytoscape 3.9.1 软件中的 Centiscape 2.2 插件筛选出核心靶点。通过 degree 值排名,排在前 15 位的靶点分别为白细胞介素-2(IL-2)、胱天蛋白酶 3(CASP3)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(HSP90AA1)、信号转导与转录激活因子 1(STAT1)、多聚 ADP 核糖聚合酶 1(PARP1)、热休克蛋白 90 α 家族 B 类成员 1(HSP90AB1)、蛋白激酶 B1(Akt1)、细胞分裂周期蛋白 42(CDC42)、生长因子受体结合蛋白 2(GRB2)、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARA)、血红素氧合酶 1(HMOX1)、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、胰岛素样生长因子 1(IGF1)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、超氧化物歧化酶 2(SOD2),见表 1。CASP3 与线粒体凋亡之间存在密切的关联。线粒体凋亡是一种重要的细胞凋亡途径,其中线粒体的功能障碍会导致 CASP3 的激活,从而触发细胞凋亡。因此后续研究将会通过 Western blotting 法探究 HJB 是否通过线粒体凋亡途径诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡。

3.3 GO 和 KEGG 通路富集分析

根据筛选结果,选择前 15 个核心靶点,使用 Metascape 分析,获得 309 个 GO 富集条目和 64 条 KEGG 通路。根据 GO 富集结果,对生物过程、细胞组分和分子功能按照 P 值进行排序,生物过程主要包括调节平滑肌细胞增殖、活性氧响应、氧化应激响应、正向调节平滑肌细胞增殖和肽的反应,细胞组分主要包括富含 ficolin-1 的颗粒腔、神经细胞体、富含 ficolin-1 的颗粒、细胞体和树枝状突起,分子功能主要包括一氧化氮合成酶调节器活性、蛋

白激酶结合、激酶结合、蛋白质同源二聚化活性和磷酸酶结合，见表 2。KEGG 富集气泡图见图 3，HJB 治疗肝癌主要作用于癌症通路、癌症中的蛋白

多糖、血脂与动脉粥样硬化、前列腺癌和 PI3K-Akt 信号通路等信号通路，因此选择 PI3K-Akt 通路进行后续研究。

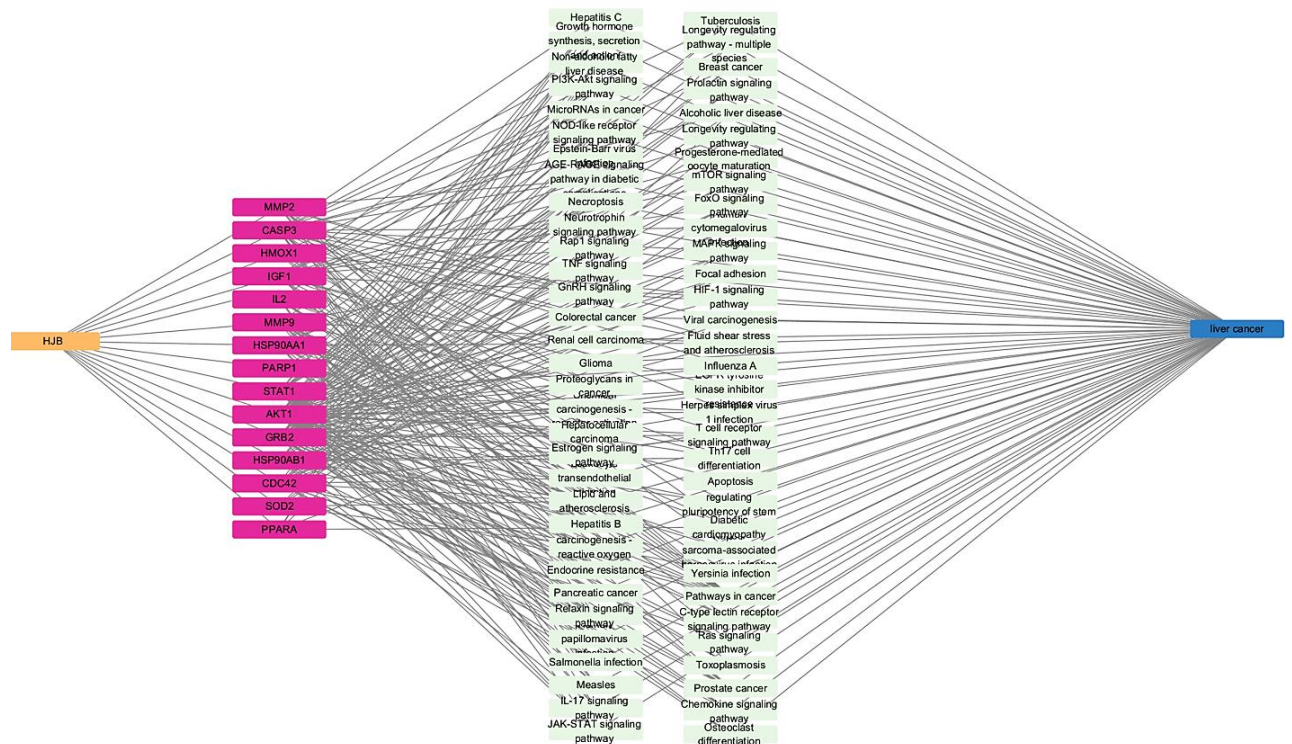


图 2 成分 - 靶点 - 通路 - 疾病网络
Fig. 2 Component-target-pathway-disease network

表 1 HJB 治疗肝癌核心靶点互作的拓扑学参数
Table 1 Topological parameters of core target interactions in HJB treatment of liver cancer

编号	靶点	介数中间性	接近中心性	拓扑系数
1	IL-2	0.036	0.530	0.148
2	CASP3	0.035	0.562	0.139
3	HSP90AA1	0.085	0.597	0.114
4	STAT1	0.031	0.499	0.168
5	PARP1	0.023	0.500	0.162
6	HSP90AB1	0.065	0.578	0.119
7	Akt1	0.126	0.621	0.110
8	CDC42	0.014	0.511	0.162
9	GRB2	0.011	0.503	0.168
10	PPARA	0.023	0.495	0.149
11	HMOX1	0.020	0.503	0.163
12	MMP2	0.013	0.500	0.169
13	IGF1	0.018	0.523	0.157
14	MMP9	0.038	0.545	0.139
15	SOD2	0.019	0.503	0.147

表 2 HJB 治疗肝癌的潜在靶点 GO 富集分析
Table 2 GO enrichment analysis of potential targets of HJB in the treatment of liver cancer

GO ID	基因功能名称	类别
GO:0048660	调节平滑肌细胞增殖	生物过程
GO:0000302	活性氧响应	生物过程
GO:0006979	氧化应激响应	生物过程
GO:0048661	正向调节平滑肌细胞增殖	生物过程
GO:1901652	肽的反应	生物过程
GO:1904813	富含 ficolin-1 的颗粒腔	细胞组分
GO:0043025	神经细胞体	细胞组分
GO:0101002	富含 ficolin-1 的颗粒	细胞组分
GO:0044297	细胞体	细胞组分
GO:0030425	树枝状突起	细胞组分
GO:0030235	一氧化氮合成酶调节器活性	分子功能
GO:0019901	蛋白激酶结合	分子功能
GO:0019900	激酶结合	分子功能
GO:0042803	蛋白质同源二聚化活性	分子功能
GO:0019902	磷酸酶结合	分子功能

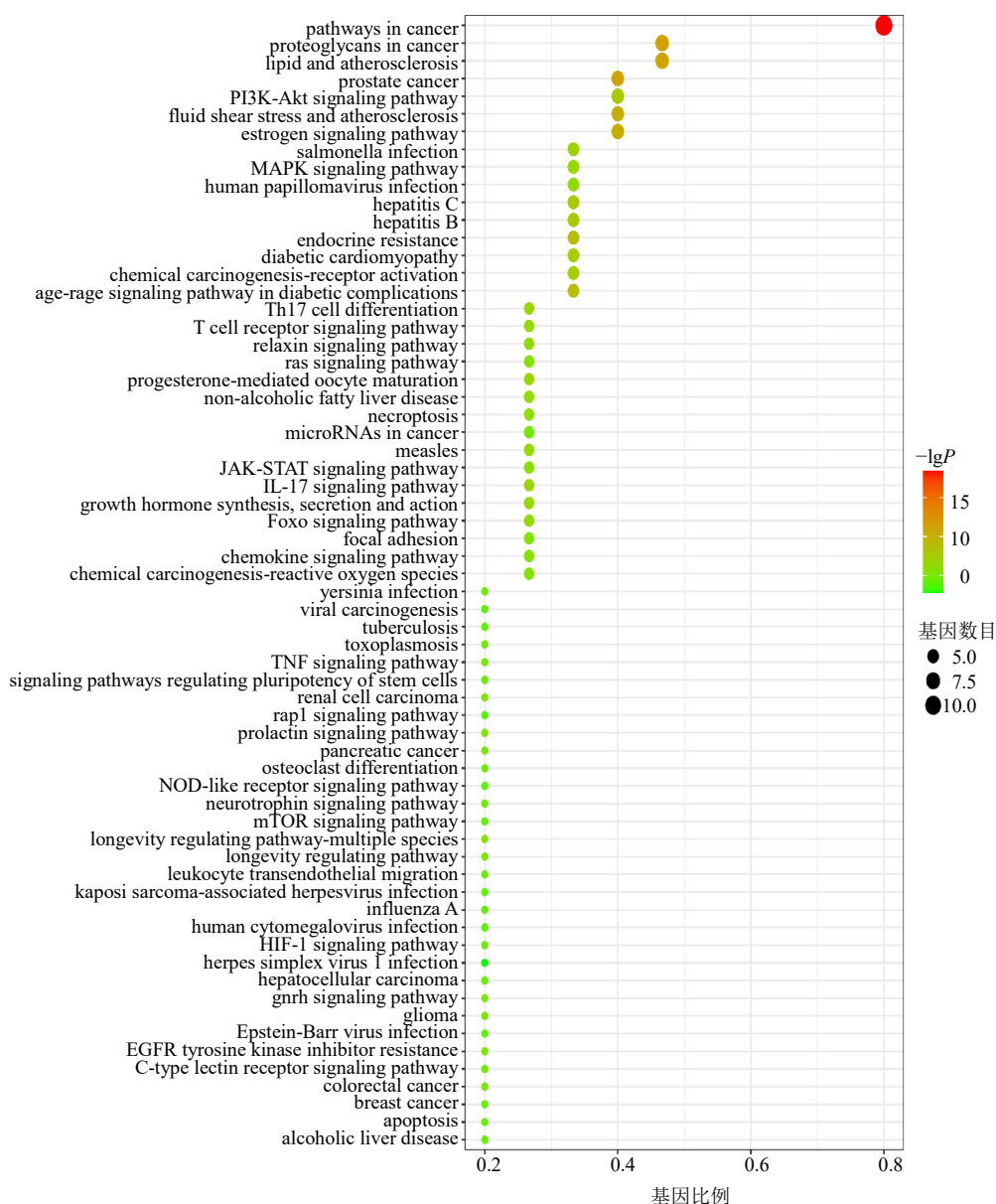


图 3 KEGG 通路气泡图

Fig. 3 KEGG pathway bubble map

3.4 分子对接结果

为了更精准地探究 HJB 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的作用, 本研究通过 PDB 数据库获得 PI3K (PDB ID: 4OYS)、Akt (PDB ID: 3O96)、mTOR

(PDB ID: 3JBZ) 蛋白结构与 HJB 进行分子对接, 分子对接结果如图 4 和表 3。其中 HJB 与 PI3K、Akt、mTOR 的对接结合自由能分别为 -9.08 、 -9.36 、 -8.04 kJ/mol, 表示其结合效果较好。

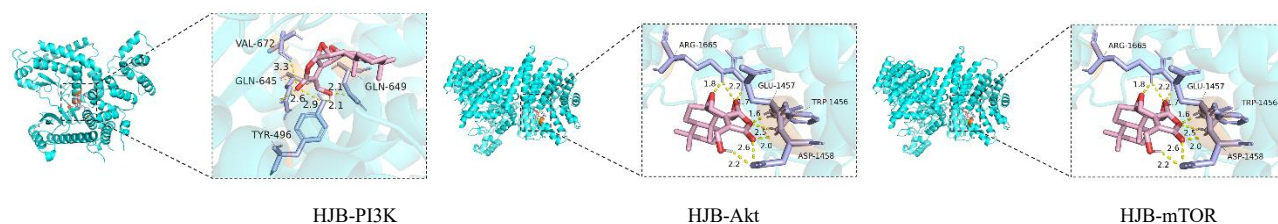


图 4 分子对接 3D 可视化图

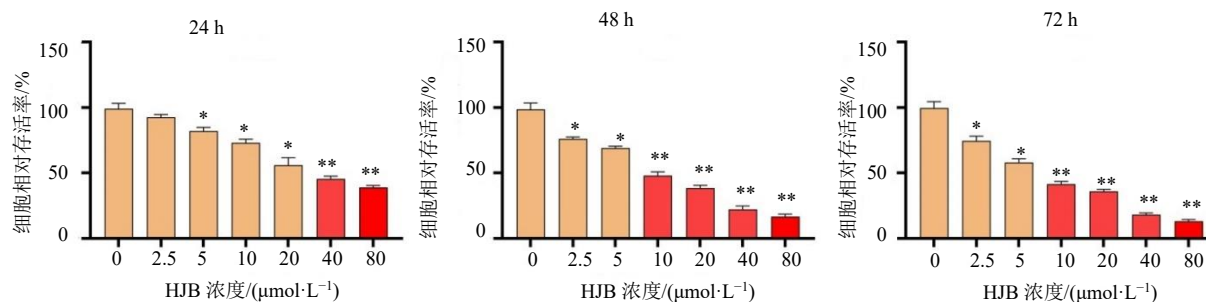
Fig. 4 3D visualization of molecular docking

表 3 HJB 与靶点结合能

基因	PDB ID	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
PI3K	4OYS	-9.08
Akt	3O96	-9.36
mTOR	3JBZ	-8.04

3.5 HJB 对 HepG2 细胞存活率的影响

如图 5 所示,与对照组相比,药物作用 24、48、72 h 后, HepG2 细胞的存活率呈时间、剂量相关性的显著下降。HJB 作用 HepG2 细胞 48 h 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 (9.85±0.87) μmol/L。故后期选用 HJB 干预的浓度设置为 5、10、20 μmol/L。



与对照组 (0 μmol·L⁻¹) 比较: **P*<0.05 ***P*<0.01。

P*<0.05 *P*<0.01 vs control group (0 μmol·L⁻¹).

图 5 HJB 对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

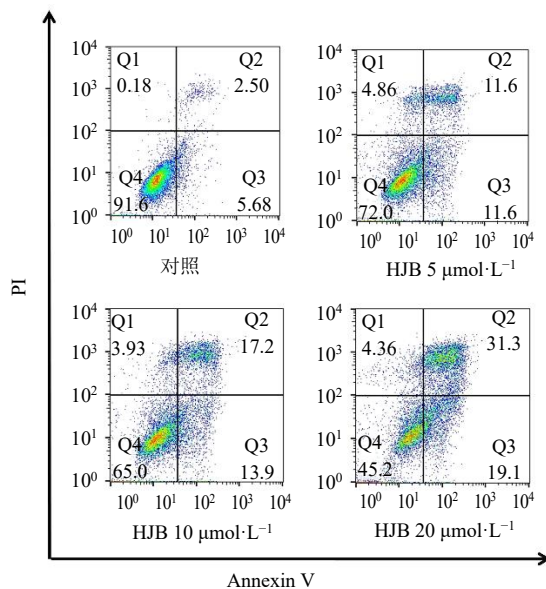
Fig. 5 Effect of HJB on survival rate of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

3.6 HJB 对 HepG2 细胞凋亡率的影响

与对照组比较, 5、10、20 μmol/L HJB 组细胞凋亡率显著增加 (*P*<0.01), 见图 6。揭示了 HJB 对细胞凋亡过程的潜在影响, 并且随着 HJB 浓度的增加, 细胞凋亡率的变化趋势也更为明显。

3.7 HJB 对 HepG2 细胞凋亡形态的影响

AO/EB 双染色法结果显示, 与空白对照组比较, 5、10、20 μmol/L HJB 组细胞形态发生改变, 细胞膜破裂, 细胞核皱缩, 细胞变小, 凋亡细胞数量增加, 并且具有浓度相关性, 见图 7。

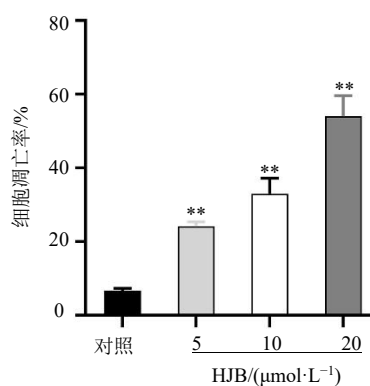


与对照组比较: ***P*<0.01。

***P*<0.01 vs control group.

图 6 HJB 对 HepG2 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

Fig. 6 Effects of HJB on the apoptotic rate of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)



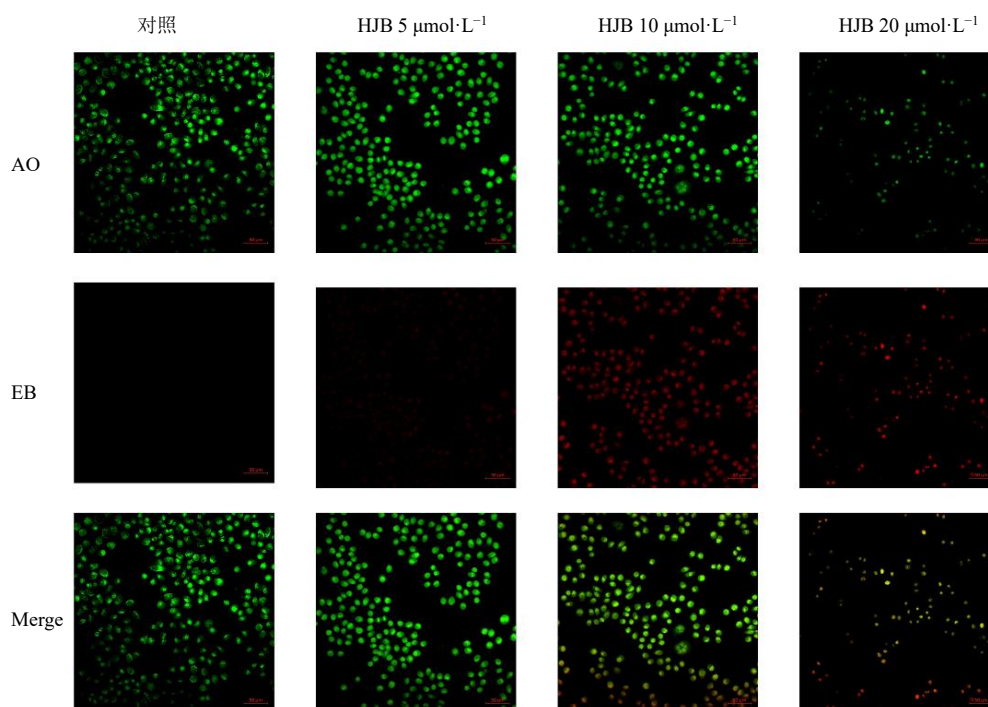


图 7 HJB 影响 HepG2 细胞凋亡的显微图 (×200)

Fig. 7 Micrograph of HJB affecting apoptosis of HepG2 cells (×200)

3.8 HJB 对 HepG2 细胞活性氧的影响

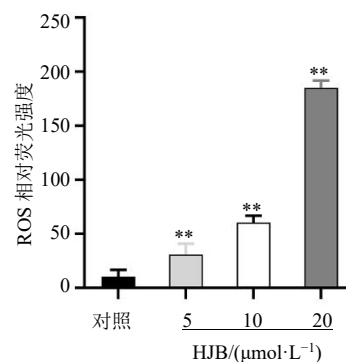
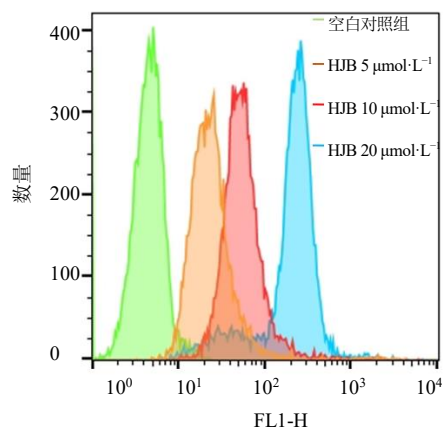
与对照组比较, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ HJB 组 HepG2 细胞的活性氧水平平均显著升高 ($P < 0.01$), 见图 8。

3.9 HJB 对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

与对照组比较, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ HJB 组 HepG2 细胞的线粒体膜电位水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图 9。

3.10 HJB 对线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ HJB 组细胞 Bcl-2、p-PI3K、p-Akt 的蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), Cyt C、Bax、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 见图 10、11。

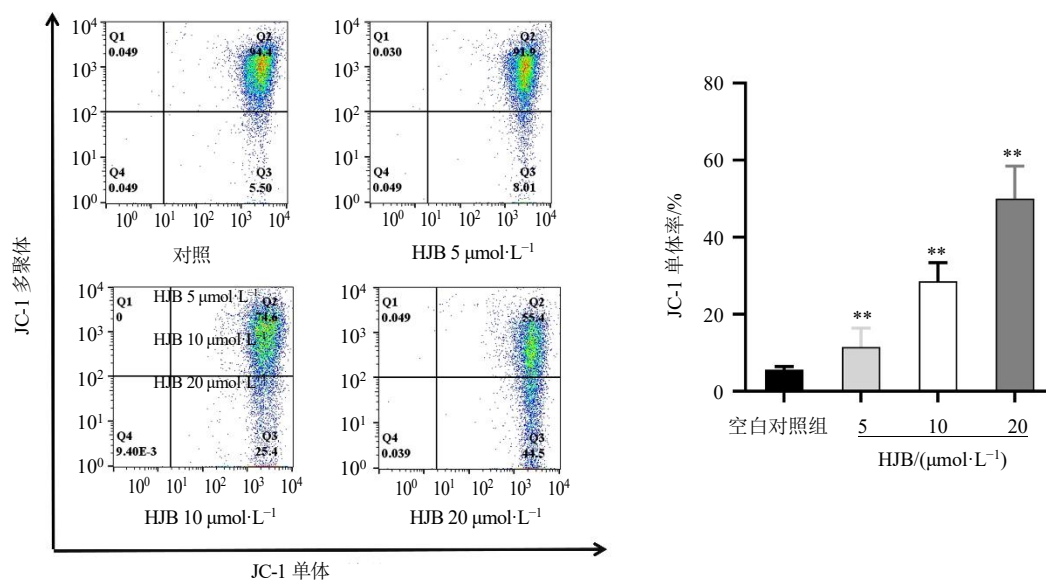


与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 8 HJB 对 HepG2 细胞活性氧水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effects of HJB on level of reactive oxygen species in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

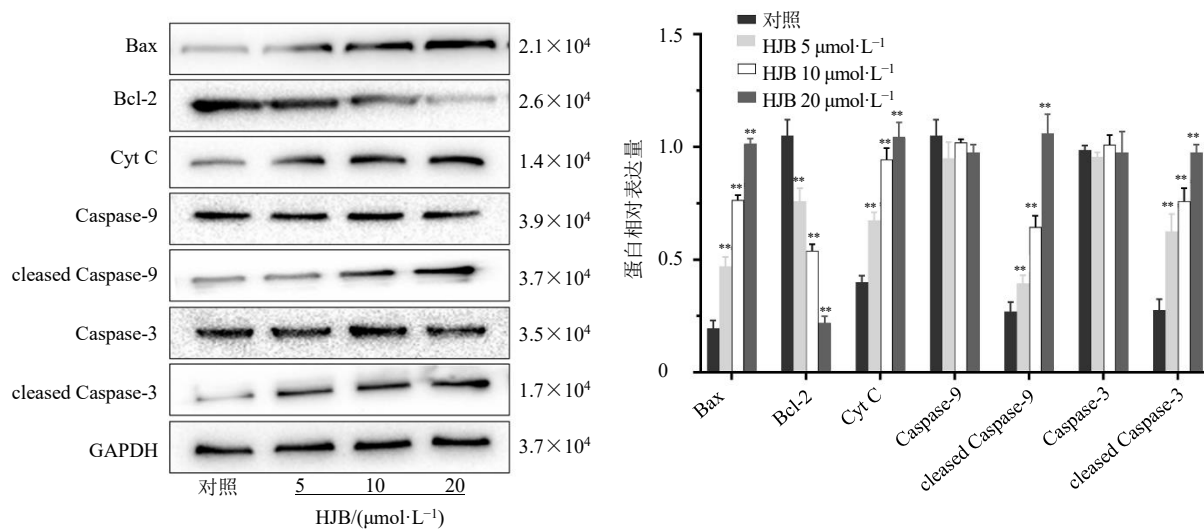


与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 9 HJB 对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Flow cytometry of the effect of HJB on mitochondrial membrane potential in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 10 HJB 对 HepG2 细胞线粒体凋亡通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

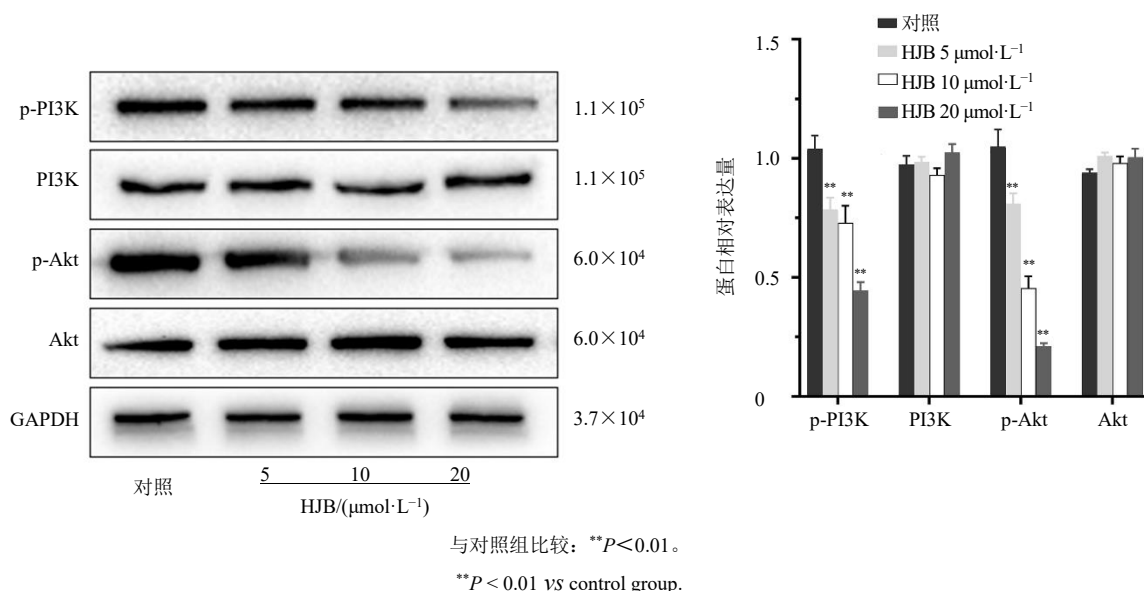
Fig. 10 Effects of HJB on expression of proteins related to mitochondrial apoptosis pathway in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

肝癌发病机制复杂,且生存时间短、预后不良,是严重威胁人们生命健康的恶性肿瘤^[13]。尽管分子靶向治疗在癌症治疗领域展现出了积极的治疗效果,但伴随而来的不良反应和耐药性问题依旧是当

前治疗中需要解决的挑战。从传统天然的中草药中挖掘及结构改造低毒、高效的抗肿瘤药物具有重要意义^[14]。

狼毒大戟属于大戟科的多年生草本植物,其根部在传统医学中被用作药材。该药材味辛,性

图 11 HJB 对 PI3K-Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 11 Effects of HJB on the expression of PI3K-Akt pathway-related proteins ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

平, 传统上被认为具有利尿、祛痰、消积和杀虫的作用。中医记载为毒性中药, 明代医学家李时珍在其著作《本草纲目》中对狼毒大戟的毒性进行了描述, 指出仅从名称便可窥见其潜在的毒性^[15]。狼毒大戟全株有毒, 药用的根部毒性最大。民间即用狼毒大戟根大枣蒸食, 用于晚期癌症和癌症术后治疗。本课题组前期研究已经证实, 狼毒大戟中二萜类化合物岩大戟内酯 B (JB) 和 HJB 对乳腺癌、肺癌和胃癌等恶性肿瘤细胞均表现出显著的抑制活性^[16-18], 但是 HJB 对肝癌相关研究开展较少, 其作用机制仍不明确。

本研究探讨 HJB 对肝癌 HepG2 细胞的增殖、凋亡的影响, 并分析其可能机制, 以期望为肝癌治疗药物的研究提供一定的实验基础。CCK-8 检测结果表明, 低、中、高浓度的 HJB 对 HepG2 细胞均表现出剂量和浓度相关性地生长和增殖抑制作用。

本研究主要探讨了 HJB 对 HepG2 细胞增殖的影响, 特别是其如何通过线粒体相关信号通路发挥作用。由于线粒体在氧化损伤中具有敏感性, 以及癌细胞在氧化还原平衡中呈现出异常状态^[19], 线粒体功能的紊乱对于活性氧引发的细胞凋亡具有关键作用。研究指出, 药物对肿瘤细胞的毒性作用部分原因是源自其诱导肿瘤细胞产生大量活性氧, 进而引发氧化应激效应^[20]。此外, 活性氧的过量产生会破坏线粒体的稳定性, 从而增加线粒体膜的通透性。这种通透性的增

加会导致线粒体膜电位的下降, 随着膜电位的降低, 线粒体的完整性受损, 导致线粒体内的 Cyt C 释放到细胞质中。在细胞质中, Cyt C 在 ATP 和 dATP 的作用下形成凋亡复合体, 进而激活 Caspase-9, 使其发生自身裂解形成 cleaved Caspase-9, 裂解的 Caspase-9 进一步激活 Caspase-3, 引发 Caspase 级联反应, 最终触发细胞凋亡^[21]。本研究结果显示, HJB 对 HepG2 细胞的作用导致细胞内活性氧水平显著上升, 线粒体膜电位降低, 并且以剂量相关性的方式影响线粒体凋亡通路中的关键蛋白表达, 包括 Bcl-2 蛋白表达的下调, 以及 Bax、Cyt C、cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的上调。

PI3K-Akt 信号通路是肿瘤发生发展的关键通路, 由于其在肿瘤发生发展过程中的关键作用, 在多种人类肿瘤中都普遍存在^[22-23]。活化的 RTKs 招募并激活 PI3K, 使膜脂质磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 (PIP2) 磷酸化, 生成磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 (PIP3)。PIP3 是丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 的对接位点。Akt 被招募到质膜上, 并被磷酸肌醇依赖性激酶 1 (PDK1) 和哺乳动物雷帕霉素靶复合物 2 (mTORC2) 磷酸化。活化的 Akt 会使其下游靶标磷酸化, 调节细胞的生存、增殖、迁移、代谢^[24-25]。本研究结果发现, HJB 可以使乳腺癌 MCF-7 细胞 p-PI3K、p-Akt 表达水平降低。

综上所述, HJB 在体外实验中显示出对肝癌

HepG2 细胞增殖的抑制效果,并能诱导细胞凋亡。这一作用可能与通过 PI3K-Akt 信号通路影响线粒体凋亡途径有关。本研究为探索狼毒大戟中二萜类化合物在抗肝癌方面的潜在效用及其作为药物开发的可行性提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张洲,朱朋艳,马金蓉,等.狼毒大戟化学成分及抗肿瘤活性研究[J].中南药学,2023,21(3):574-581.
- [2] 张元斌.大戟属有毒中药狼毒和京大戟醋制解毒存效机制研究[D].南京:南京中医药大学,2021.
- [3] Jian B Y, Zhang H, Liu J C. Structural diversity and biological activities of diterpenoids derived from *Euphorbia fischeriana* steud [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 935.
- [4] Li Y N, He J, Zhang J, et al. Existing knowledge on *Euphorbia fischeriana* Steud. (Euphorbiaceae): Traditional uses, clinical applications, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114095.
- [5] 龚飞,吴思明,徐磊,等.17-羟-岩大戟内酯B对人三阴性乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J].中国药房,2023,34(12):1415-1421.
- [6] 王晓丽,韩翠艳,李宏铃,等.Fas/FasL 信号途径参与17-羟-岩大戟内酯B诱导U251细胞凋亡[J].中药药理与临床,2017,33(1):46-49.
- [7] 王晓丽,周丽,刘吉成.17-羟-岩大戟内酯B对K562细胞增殖及凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(9):197-200.
- [8] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [9] 杨晨宇,尚新悦,姚国栋.中药活性成分通过调控PKM2发挥抗肿瘤作用的研究进展[J].中草药,2022,53(2):590-598.
- [10] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读[J].中草药,2021,52(14):4119-4129.
- [11] 杨燚,王毛毛,于淼,等.基于网络药理学、分子对接和体外实验探讨防己生物碱类活性成分逆转乳腺癌耐药的作用机制[J].中草药,2023,54(9):2841-2851.
- [12] 田辛晨,王浩辰,张一鸣,等.基于网络药理学和实验验证探究狼毒大戟醇提物治疗肝细胞癌的分子机制[J].中国药理学通报,2023,39(7):1354-1361.
- [13] 曹毛毛,陈万青.中国癌症筛查现状[J].科技导报,2023,41(18):11-17.
- [14] 董政起,马培.寻找大自然馈赠的抗肿瘤药物[J].大众健康,2022(2):46-49.
- [15] 李雅楠,杨华,赫军,等.狼毒大戟化学成分及其生物活性研究[J].中国药理学杂志,2022,57(17):1419-1424.
- [16] 沈雷,李永涛,张善强,等.岩大戟内酯B刺激MCF-7细胞条件培养基降低人脐静脉血管内皮细胞的增殖和迁移[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(22):102-107.
- [17] 刘雷,马玉坤,孙宇,等.MSPD-UPLC法同时测定狼毒大戟中4种成分[J].中成药,2020,42(6):1520-1525.
- [18] 王晓丽,洪楠楠,韩翠艳,等.岩大戟内酯4种活性单体对人脑胶质瘤U251细胞增殖及凋亡的影响[J].医学研究杂志,2017,46(12):46-50.
- [19] Liou G Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44(5): 479-496.
- [20] Dong X, Fu J, Yin X B, et al. Induction of apoptosis in HepaRG cell line by *Aloe-emodin* through generation of reactive oxygen species and the mitochondrial pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 685-696.
- [21] Kaplan P, Tatarkova Z, Siononova M K, et al. Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7698.
- [22] Kumar S, Agnihotri N. Piperlongumine, a piper alkaloid targets Ras/PI3K/Akt/mTOR signaling axis to inhibit tumor cell growth and proliferation in DMH/DSS induced experimental colon cancer [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 109: 1462-1477.
- [23] Muñoz J P, Carrillo-Beltrán D, Aedo-Aguilera V, et al. Tobacco exposure enhances human papillomavirus 16 oncogene expression via EGFR/PI3K/akt/c-Jun signaling pathway in cervical cancer cells [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3022.
- [24] Engelman J A. Targeting PI3K signalling in cancer: Opportunities, challenges and limitations [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 550-562.
- [25] Fruman D A, Rommel C. PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(2): 140-156.

[责任编辑 金玉洁]