

【药效学评价】

杠板归抑制小鼠 H22 肝癌的作用机制

周琳¹, 杜金城², 杜钢军^{1*}

1. 河南大学药学院 药物研究所, 河南 开封 475004

2. 湖南中医药大学 中医学院, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 观察杠板归对小鼠 H22 肝癌的抑制作用, 分析其可能的作用机制。 **方法** 建立 H22 皮下移植小鼠模型评价杠板归对肿瘤生长的影响; 二甲苯诱导的耳肿胀评价杠板归对荷瘤小鼠炎症的影响; 网络药理学分析杠板归抗肿瘤和抗炎可能的作用机制。 **结果** 杠板归对 H22 皮下肿瘤生长有明显抑制作用 ($P < 0.05$), 显著降低二甲苯诱导的荷瘤小鼠耳肿胀 ($P < 0.05$)。通过上海有机所化学专业数据库以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 筛选杠板归 4 种有效成分, 与生物芯片肝癌上下调基因蛋白分子对接得到 106 个预测靶点, 预测靶点与 TTD 比对得到 13 个肝癌治疗靶点。蛋白相互作用网络 (PPI) 分析 STAT3、IL-6、IL-1 β 、HBG2、TLR4、HBB、HBE1、HBD 为 8 个核心靶点, 其参与 27 个 KEGG 通路和 27 个生物过程。 **结论** 杠板归对小鼠 H22 肝癌有抑制作用, 能减轻荷瘤小鼠炎症, 其作用与 4 个活性成分参与“泛素化介导蛋白水解”、“核因子 (NF)- κ B 信号传导”、“Janus 激酶-信号转导与转录激活子 (JAK-STAT) 信号传导”等通路有关。

关键词: 杠板归; 肝癌; 炎症; 网络药理学; JAK-STAT 信号传导

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2019) 10-1935-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.10.004

Inhibitory effect and action mechanism of *Polygonum perfoliatum* on H22 liver carcinoma in miceZHOU Lin¹, DU Jincheng², DU Gangjun¹

1. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China

2. College of traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To observe the inhibitory effect of *Polygonum perfoliatum* L. on H22 liver carcinoma in mice and explore its possible action mechanisms. **Methods** Effect of *Polygonum perfoliatum* L. on tumor growth was evaluated using H22 subcutaneously transplanted tumor model in mice, effect of *Polygonum perfoliatum* L. on inflammation was examined by ear edema in tumor bearing mice. Network pharmacology was used to analyze the possible action mechanisms by which *Polygonum perfoliatum* L. exerts anti-tumor and anti-inflammation efficacy. **Results** *Polygonum perfoliatum* L. had an anti-tumor effect on H22 liver carcinoma in mice and obviously decreased xylene-induced ear edema in tumor-bearing mice ($P < 0.05$). 4 active components with OB $\geq 30\%$ and DL ≥ 0.18 in Shanghai Institute of Organic Chemistry database, and up-and-down genes of liver cancer in the biochip were selected for molecular docking. 106 predicted targets were compared to liver cancer therapeutic targets in TTD, there were 13 liver cancer therapeutic targets related with four active components. PPI analysis indicates that STAT3, IL6, IL1B, HBG2, TLR4, HBB, HBE1, HBD are 8 core targets which involve in 27 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways and 27 GO (gene ontology) biological process. **Conclusion** *Polygonum perfoliatum* L. has an inhibitory effect on H22 liver cancer and could decrease inflammation in tumor bearing mice, its action mechanisms are associated 4 active components which involve in "ubiquitination-mediated proteolysis", "NF- κ B signaling", and "JAK-STAT signaling", et al pathway.

Key words: *Polygonum perfoliatum* L.; liver carcinoma; inflammation; Network Pharmacology; JAK-STAT signaling

收稿日期: 2019-04-08

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (182300410310)

第一作者: 周琳 (1995—), 女, 河南省开封市人, 研究生。

*通信作者: 杜钢军, 教授, 研究方向为中药药理学。Tel: 15037883506 E-mail: dgjlh@163.com

杠板归为多年生草本蓼科属植物,又名蛇不过、河白草等,其资源丰富,广泛分布全国各地^[1]。杠板归主要成分为黄酮类、蒽醌类、苯丙素等^[2-3],主要用于肾炎水肿、百日咳、泻痢、湿疹、肿瘤等。现代药理学研究发现,杠板归具有抗炎和抗菌的作用^[4]。据王安卿《采药志》、《纲目拾遗》等资料记载,杠板归具有抗肿瘤作用。但目前对其研究较少,作用机制尚不明确。肝癌是中国最常见的肿瘤之一,居所有肿瘤发病率第4位,死亡率第3位^[5-7],新诊断病例在中国仍处于上升趋势^[8]。本文采用小鼠H22肝癌移植肿瘤模型观察杠板归的肝癌抑制作用,运用网络药理学分析杠板归抑制肝癌的机制,为进一步深入研究杠板归在肿瘤防治方面的应用提供基础。

1 材料

1.1 药材

杠板归 *Polygonum perfoliatum* L.,购自河南省开封市天济大药房,经河南大学生药教研室鉴定为杠板归的地上部分。

1.2 实验动物

SPF级雌性KM小鼠,体质量(26±2)g,许可证号SCXK(豫)2015-0002,购自河南省医学实验动物中心。

1.3 仪器

BSA124S-CW型电子天平(郑州南北仪器设备有限公司);EM-KC150数显游标卡尺(河东区星光扳钳工具厂);超净工作台(苏州仁川洁净科技有限公司);微量移液器(北京麦尔泰克科技有限公司);YLS-1A多功能小鼠自主活动记录仪(北京拜安吉科技有限公司);AXTD4台式低速平衡离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司)等。

1.4 试剂

二甲苯(天津市富晨化学试剂厂,批号20150812)。

2 方法

2.1 杠板归水提物制备

称取杠板归干燥全草40g,加20倍(800mL)蒸馏水浸泡1h,煎煮30min,滤出药液。重复上述过程,煎煮3次。合并3次滤液加热浓缩至200mL(每mL相当于0.2g原药材),-80℃冰箱分装冻存,临用前蒸馏水稀释到所需浓度。

2.2 H22皮下移植小鼠模型建立及分组给药

取接种10d的H22腹水型肝癌小鼠,处死后于无菌条件下抽取乳白色腹水,离心,弃去上清液,收集沉淀细胞,用无菌生理盐水稀释成细胞悬液(1×10⁷个/mL),每只KM小鼠右肢腋部皮下接种瘤液

0.2mL。接种小鼠随机分为模型组和杠板归组,每组10只。肿瘤接种次日,杠板归组按小鼠体质量4g/kg ig杠板归水煎液,每天1次。

2.3 观察指标

每周测定小鼠体质量和自主活动2次。待肿瘤手触长出后用数显游标卡尺测量肿瘤长径和宽径,每周2次。待模型组肿瘤平均直径>25mm时终止实验,处死小鼠,剥离肿瘤称质量。计算肿瘤体积及肿瘤抑制率。

$$\text{肿瘤体积}=(\text{长径}\times\text{宽径}^2)/2$$

$$\text{肿瘤抑制率}=(\text{模型组平均肿瘤质量}-\text{给药组平均肿瘤质量})/\text{模型组平均肿瘤质量}^{[9]}$$

2.4 二甲苯诱导的小鼠耳肿胀

实验终止当日,小鼠给药后30min,取40μL二甲苯涂于小鼠右耳处,致炎,左耳对照。涂上二甲苯后30min,处死小鼠,剪下小鼠左右耳并用打孔器在同一部位打下耳片,分析天平称质量。以两耳片质量差值为耳肿胀度,并计算肿胀抑制率。

$$\text{肿胀抑制率}=(\text{模型组耳平均肿胀度}-\text{给药组耳平均肿胀度})/\text{模型组耳平均肿胀度}^{[10]}$$

2.5 杠板归有效成分筛选

采用上海有机所化学专业数据库(<https://202.127.145.134/scdb/>)对杠板归成分进行检索,得到16种有效成分,保存其CAS号。利用中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP,<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)查询并根据口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18的标准对有效成分进行筛选。利用PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载有效成分的3D结构。

2.6 肝癌上调和下调基因

利用Gene Expression Omnibus(GEO,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库,以“hepatic carcinoma”为关键词搜索与肝癌相关的人类基因差异表达芯片,通过GEO2R功能分析表达相差2倍以上且P<0.05的上调和下调基因。其中以logFC>1.5的基因为肝癌的上调基因,logFC<-1.5的基因为肝癌的下调基因。

2.7 分子对接

利用SystemsDock(<https://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>)在线分子对接工具,将肝癌的上调和下调基因与杠板归有效成分的3D结构进行分子对接,将评分(score)≥6的靶标作为预测靶点。

2.8 杠板归有效成分-预测靶点(C-T)网络图

利用Cytoscape 3.2.1软件构建成分-靶点网络

图,在网络中,杠板归有效成分和预测靶点由节点

2.9 肝癌治疗靶点筛选

通过 Therapeutic Target Database (TTD, <https://db.idrblab.org/ttd/>),以“liver cancer”和“cancer”为关键词收集与肝癌相关的治疗靶点,通过与预测靶点对比筛选出杠板归肝癌治疗靶点。

2.10 蛋白相互作用网络(PPI)构建

通过 STRING 数据库 (string-db.org/)上传杠板归肝癌治疗靶点,限定物种为人源(Homo sapiens)得到治疗靶点蛋白相互作用关系图。下载 TVS 格式文件,将其导入 Cytoscape 3.2.1 软件,利用 Network Analyzer 功能分析网络中的重要靶点,构建 PPI 网络图。以节点 degree 值反映靶点大小,并根据 degree 值筛出核心靶点。

2.11 GO 注释分析与 KEGG 通路分析

将杠板归肝癌治疗靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>)进行 GO 注释和 KEGG 通路富集分析,通过 $P < 0.05$ 筛选出与杠板归治疗肝癌相关通路和生物过程。进一步通过

表示,两个节点之间相互作用由边相连表示。

Omicshare (<http://www.omicshare.com/>)在线对 GO 注释和 KEGG 富集分析结果进行可视化处理。

2.12 杠板归有效成分-蛋白靶点-信号通路网络图构建

利用 Cytoscape 3.2.1 软件,以杠板归有效成分,杠板归肝癌治疗靶点以及信号通路为节点(node),用 Merge 功能构建杠板归有效成分-蛋白靶点-信号通路网络图。

2.13 统计方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 18.0 软件分析,组间差异用单因素方差分析。

3 结果

3.1 杠板归的抗肿瘤作用

小鼠接种 H22 瘤株后,第 5 天长出手触可感觉的肿瘤,之后小鼠因肿瘤增长快速使体质量迅速增加,自主活动降低。与模型组比较,杠板归组肿瘤和体质量增长均较慢($P < 0.05$),自主活动增加,见图 1。杠板归组肿瘤抑制率为 37.36%($P < 0.05$),见表 1。

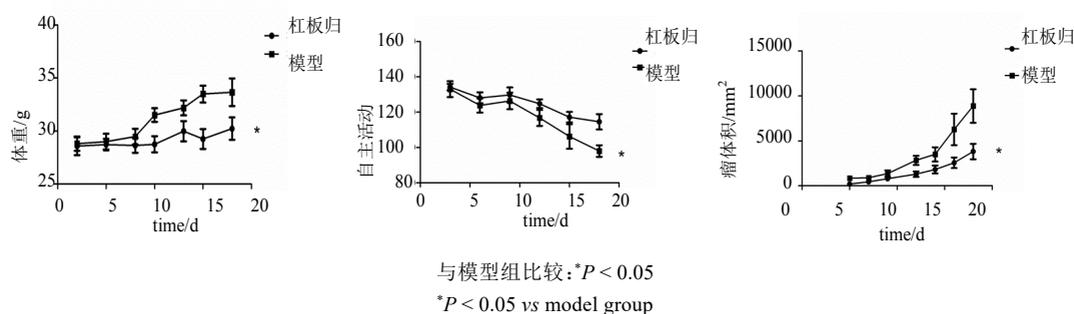


图 1 荷瘤小鼠体质量、自主活动、肿瘤体积

Fig.1 Body weight, spontaneous activity and tumor volume in tumor-bearing mouse

表 1 杠板归对小鼠 H22 肝癌的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of *Polygonum perfoliatum* on H22 liver carcinoma in mice

组别	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	2.99±1.74	—
杠板归	1.87±0.70*	37.36

与模型组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs model group

3.2 杠板归的抗炎作用

模型小鼠平均耳肿胀度为 0.025,与模型组比较,杠板归组平均耳肿胀度为 0.006($P < 0.05$),肿胀抑制率为 75.75%,见表 2。

表 2 杠板归的抗炎作用

Table 2 Effect of *Polygonum perfoliatum* on inflammation

组别	肿胀度	肿胀抑制率/%
模型	0.025±0.004	—
杠板归	0.006±0.007*	75.75

与模型组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs model group

3.3 杠板归有效成分筛选

通过 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 的标准筛选得到杠板归 4 种有效成分,分别为槲皮素、白桦脂酸、山柰酚、异鼠李素,见表 3。

表3 杠板归有效成分

Table 3 Active constituent of *Polygonum perfoliatum* L.

TCMSP ID	成分名称	OB/%	DL
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
MOL012811	白桦脂酸	55.38	0.78
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31

3.4 疾病的上调和下调基因及预测靶点筛选

下载编号为GSE49515的人类基因芯片,通过GEO2R功能分析比较肝癌(hepatic carcinoma)与正

常人(healthy)两组之间差异,下载top250数据,得到肝癌的上调和下调基因。其中上调基因462个($\lgFC \geq 1.5, P < 0.05$),下调基因1077个($\lgFC \leq -1.5, P < 0.05$)。通过SystemsDock分子对接,筛选score ≥ 6 的基因预测靶点106个。

3.5 杠板归成分-预测靶点(C-T)网络图

将预测靶点与杠板归有效成分导入Cytoscape 3.2.1软件中得到杠板归成分-预测靶点(C-T)网络图,见图2。该网络共有节点108个,边318条。其中粉色代表杠板归有效成分,红色代表27个上调基因,绿色代表77个下调基因。

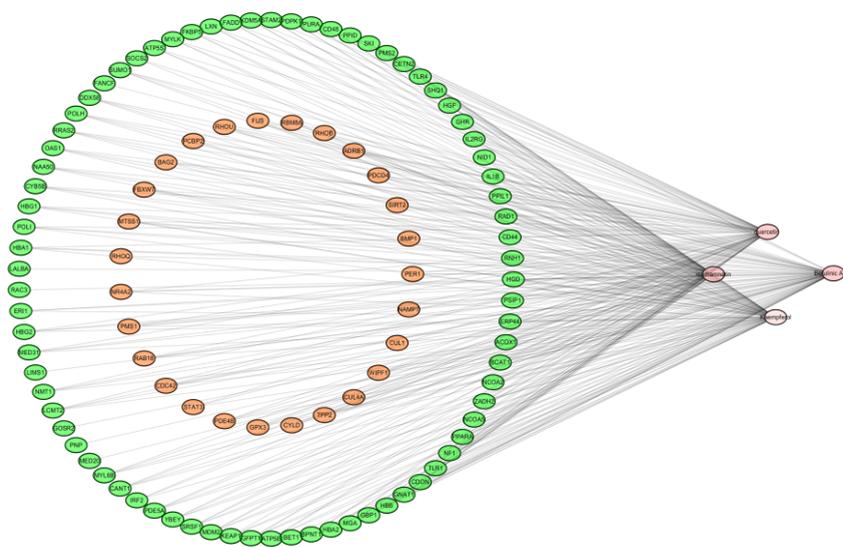


图2 杠板归成分-靶点(C-T)网络图

Fig.2 Components- targets(C-T)network of *Polygonum perfoliatum*

3.6 杠板归肝癌治疗靶点筛选

Therapeutic Target Database(TTD)搜索肝癌相关治疗靶点与106个预测靶点对比,得到13个杠板归肝癌治疗靶点,见表4。

3.7 蛋白相互作用网络图(PPI)

将蛋白相互作用文件导入Cytoscape 3.2.1软件中,得到杠板归蛋白相互作用网络图,见图3。其中共有节点96个,边514条,图中红色代表核心靶点。通过拓扑参数度数评判网络中每个节点的重要性,节点的度数与节点相连边的数量相一致。即度数越大,网络中与该节点直接相关的节点越多^[1],表明该节点在网络中占重要地位。根据网络拓扑学参数,筛选出degree >13 的8个核心靶点,分别为STAT3、IL6、IL1B、HBG2、TLR4、HBB、HBE1、HBD,见表5。

3.8 GO注释分析与KEGG通路分析

表4 杠板归肝癌治疗靶点

Table4 Cancertherapeutic targets of *Polygonum perfoliatum*

序号	编号	靶点	来源
1	P40763	STAT3	TTD
2	Q07869	PPARA	TTD
3	P68871	HBB	TTD
4	P69905	HBA2	TTD
5	Q00987	MDM2	TTD
6	O76074	PDE5A	TTD
7	P69892	HBG2	TTD
8	P69905	HBA1	TTD
9	P69891	HBG1	TTD
10	O00206	TLR4	TTD
11	P31785	IL2RG	TTD
12	P01584	IL1B	TTD
13	P16070	CD44	TTD

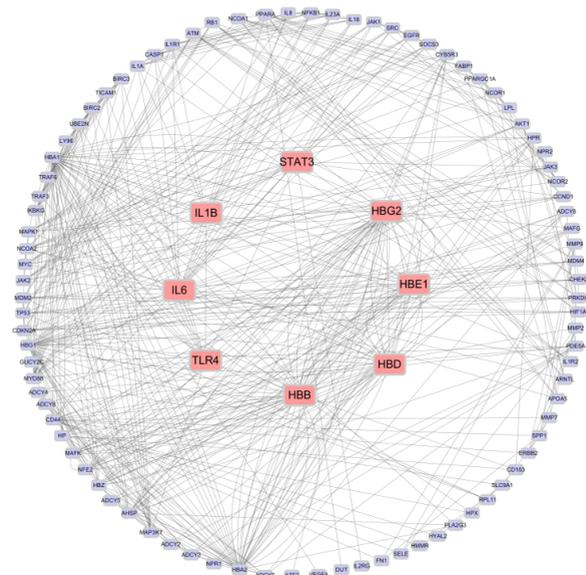


图3 杠板归蛋白相互作用网络图

Fig.3 Protein-protein interaction network of *Polygonum perfoliatum*

表5 杠板归核心靶点

Table 5 Core targets of *Polygonum perfoliatum*

靶点	蛋白	Degree
STAT3	Signal transducer and activator transcription 3	15
IL6	Interleukin-6	20
IL1B	Interleukin-1 beta	14
HBG2	Hemoglobin subunit gamma-2	45
TLR4	Toll-like receptor 4	13
HBB	Hemoglobin subunit beta	52
HBE1	Hemoglobin subunit epsilon	34
HBD	Hemoglobin subunit delta	34

对杠板归13个肝癌治疗靶点进行GO生物过程富集,筛选27个生物过程($P < 0.05, \text{count} > 9$),见图4。生物通路主要有“免疫反应”、“信号转导”、“细胞凋亡”、“炎症反应”、“细胞增殖”等。对杠板归13个肝癌治疗靶点进行KEGG信号通路富集,筛选信号通路27条($P < 0.05, \text{count} > 9$),见图5。KEGG主要通路有“泛素化介导蛋白水解”、“核因子(NF)- κ B信号转导”、“Janus激酶-信号转导与转录激活子(JAK-STAT)信号转导”、“磷脂酰肌醇3激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶(PI3K-Akt)信号转导”、“Toll样受体信号转导”等。

3.9 杠板归有效成分-蛋白靶点-信号通路网络图

利用Cytoscape 3.2.1软件中的Merge功能构建杠板归有效成分-蛋白靶点-信号通路网络图,见图6。该图共有节点45个,边99条,直观地呈现了4个有效成分、13个靶基因、27条作用通路和肝癌疾病间的关联。体现了杠板归多成分、多靶点和多通路

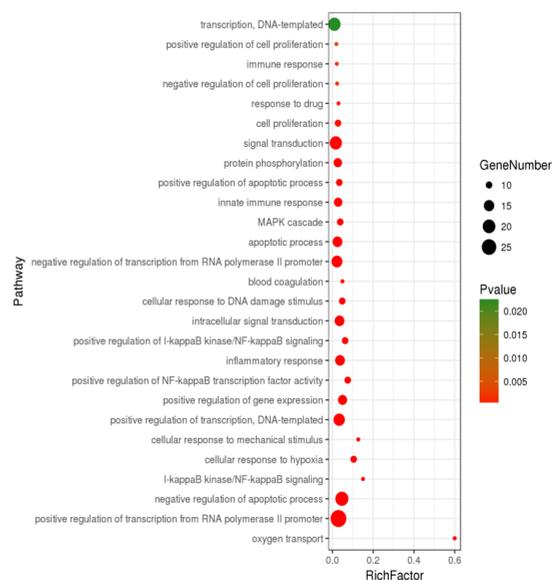


图4 杠板归GO注释分析

Fig.4 GO biological processes of *Polygonum perfoliatum*

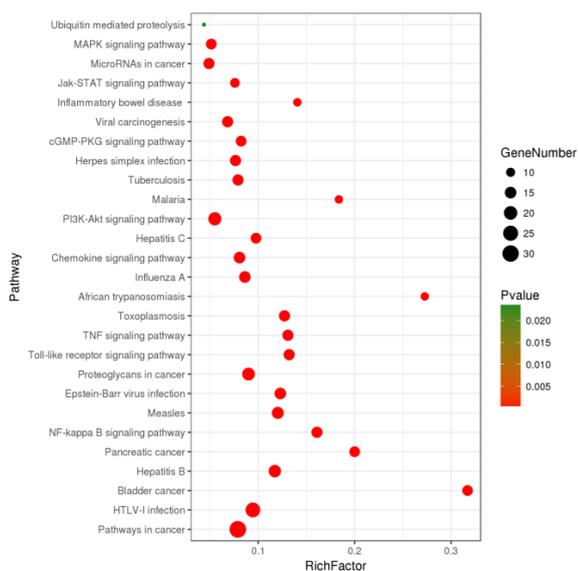


图5 杠板归KEGG通路分析

Fig. 5 KEGG pathway of *Polygonum perfoliatum*

的抗肿瘤作用。其中绿色代表信号通路,蓝色代表杠板归肝癌治疗靶点,红色代表杠板归有效成分。

4 讨论

动物肿瘤模型是筛选和评价抗肿瘤药物的有效手段,常用的动物肿瘤模型有自发性肿瘤模型、诱发性肿瘤模型和移植性肿瘤模型,其中移植性肿瘤模型有实验周期短、肿瘤发病时间一致、肿瘤大小均匀等优点,最常用于筛选和评价抗肿瘤药物。本研究采用小鼠 H22 肿瘤模型观察杠板归水煎液对肝癌生长的影响,其肿瘤抑制率为 37.36%,达到了抗肿瘤中药活性筛选标准,证实了其确切的抗肿瘤作用。因为炎症和肿瘤发展密不可分,本研究也在荷瘤小鼠体内观察了杠板归水煎液对耳肿胀的影响,发现其对荷瘤小鼠也有明显抗炎作用,与常规肿瘤化疗药物通常引起损伤性炎症明显不同。

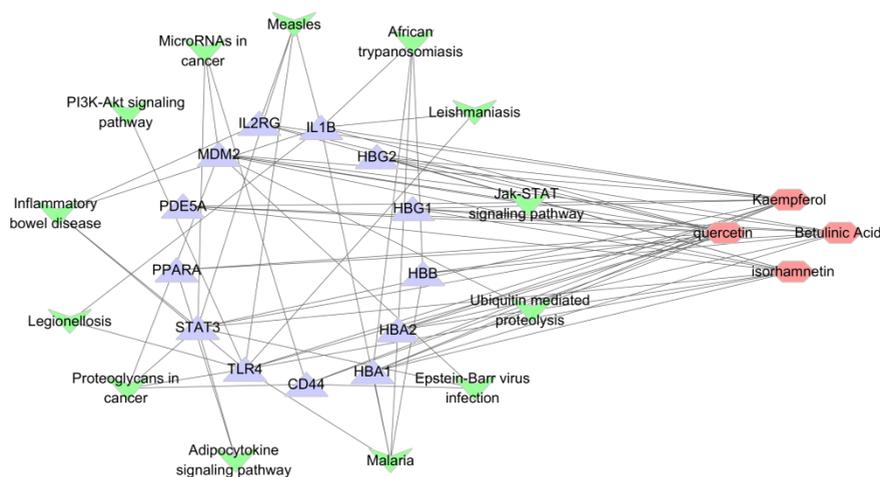


图6 杠板归有效成分-蛋白靶点-信号通路网络图

Fig.6 Active constituent-protein targets-signaling pathway network of *Polygonum perfoliatum*

网络药理学为分析中药材多组分疾病防治机制提供了强大的工具,为本研究进一步分析杠板归的肝癌抑制作用奠定了基础。利用网络药理学方法,筛出杠板归 4 种有效活性成分及 106 个预测靶点, PPI 分析显示靶点蛋白之间的相互作用关系,筛出 8 个核心靶点分别为 STAT3、IL-6、IL-1 β 、HBG2、TLR4、HBB、HBE1、HBD。KEGG 分析显示杠板归肝癌治疗靶点主要涉及“JAK-STAT 信号传导”、“泛素化介导蛋白水解”、“PI3K-Akt 信号传导”、“NF- κ B 信号传导”、“Toll 样受体信号传导”等信号通路。JAK-STAT 信号通路是一条由细胞因子刺激的信号转导通路,参与细胞增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要生物学过程,与诸多慢性肝病的发生发

展密切相关^[12-13]。在 JAK1/STAT3 信号途径中, STAT3 蛋白是转录活化因子家族和信号转导中的重要成员^[14]。研究发现 STAT3 能被 IL-12、IL-23 激活,从而促进 IL-17 和干扰素- γ 等炎症因子的表达。杠板归的 4 个活性成分可能和上述信号通路中多个重要靶点发生作用,这可能是杠板归抗肿瘤和抗炎的主要机制。通过杠板归有效成分-蛋白靶点-信号通路网络图可以看出 IL-1 β 、IL6 等炎症相关基因可能是杠板归的 4 种有效成分的核心靶点。

泛素化修饰是真核生物细胞内重要的翻译后修饰类型,通过调节蛋白质活性、稳定性参与各项细胞通路过程,对维持正常生命活动具有重要意义^[15-16]。此外,泛素化修饰还能参与 DNA 复制转

录、炎症反应、免疫应答、细胞周期与凋亡等诸多生理过程^[17-18]。杠板归的4个活性成分对此过程均有作用,可能也是其抗肿瘤和抗炎的机制之一。

综上所述,杠板归具抗肿瘤作用,其成分复杂,网络药理学证实了其通过多成分、多靶点和多通路相互作用阻止肝癌生长,为进一步深入研究杠板归在肿瘤防治方面的应用提供了基础,对其作用机制的进一步验证有望为肿瘤防治提供新思路。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 黄桂坤,郭小葆,黎为能,等.中药杠板归化学成分及其药理作用的研究进展[J].广州化工,2017,45(12):26-28,61.
- [3] 孙欣,陈华国,周欣.杠板归药材的化学成分、质量控制及药理作用研究进展[J].山东医药,2017,57(39):110-113.
- [4] 徐丽丽,徐一,郭秋言,等.杠板归的研究进展[J].中医药导报,2017,23(24):118-122.
- [5] Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [6] Shiraha H, Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis [J]. Int J Oncol, 2013, 42(4): 1133-1138.
- [7] 孙康,秦建民. Hedgehog 信号通路在肝癌发生发展中的生物学作用 [J]. 外科理论与实践, 2015, 20(1): 87-90.
- [8] 邵峰,曾普华,郜文辉,等.中医药治疗原发性肝癌用药规律的文献研究 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(11): 117-119.
- [9] 陶锋,张如松.杠板归的体内外抗肿瘤作用实验研究[J].中华中医药学刊,2013,31(9):2019-2021.
- [10] 黄鹤飞,张长城,袁丁,等.杠板归抗炎及抑菌活性部位研究[J].安徽医药,2008,12(7):595-596.
- [11] 章亮,陈泽慧,陈韩英,等.基于网络药理学的白屈菜抗肿瘤分子机制研究[J].中草药,2018,49(3):646-657.
- [12] 陈浩,李七一,陆曙.中医药调控 JAK/STAT 信号通路的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(19): 2258-2262.
- [13] 王欢,谢进,何惠芳,等.茵栀黄颗粒作为肝病辅助用药作用机制的网络药理学研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(12): 1585-1587.
- [14] Shi Z H, Jiang W H, Wang M, et al. Inhibition of JAK/STAT pathway restrains TSLP-activated dendritic cells mediated inflammatory T helper type 2 cell response in allergic rhinitis [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 430(1/2): 161-169.
- [15] Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, et al. The K₄₈-K₆₃ branched ubiquitin chain regulates NF- κ B signaling [J]. Molecular Cell, 2016, 64(2): 251-266.
- [16] 宋勇飞,张衍梅,方梦蝶,等.蛋白亚细胞定位与肿瘤关系的研究进展 [J]. 肿瘤, 2017, 37(6): 657-662.
- [17] Shaid S, Brandts H, Serve H, et al. Ubiquitination and selective autophagy [J]. Cell Death Differ, 2013, 20(1): 21-30.
- [18] Beli P, Jackson S P. Ubiquitin regulates dissociation of DNA repair factors from chromatin [J]. Oncotarget, 2015, 6(17): 14727-14728.