

## 【实验研究】

## 雷公藤多苷片生物碱类成分抗肝癌作用网络药理学探讨及诱导肝癌细胞毒性验证

宫 贺<sup>1</sup>, 罗嘉仪<sup>1</sup>, 高 雪<sup>1</sup>, 纪瑞锋<sup>1</sup>, 刘昌孝<sup>1, 2\*</sup>, 何 新<sup>1\*</sup>

1. 广东药科大学, 广东 广州 510006

2. 天津药物研究院, 天津 300462

**摘 要:** 目的 基于网络药理学结合分子对接技术探讨雷公藤多苷片(TPT)生物碱类成分抗肝癌作用机制以及细胞实验验证TPT生物碱类成分诱导肝癌细胞毒性的作用。方法 利用Swiss Target Prediction和Targetnet数据库预测TPT中9个生物碱类成分[雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤春碱、雷公藤定碱、雷公藤宁碱A、18-O-(3-糠酰)雷公藤春碱、卫矛碱、peritassine A、雷公藤新碱]的作用靶点。借助Genecards、OMIM和TTD数据库检索肝癌的相关靶点,将两者输入Venny在线工具交集得到生物碱类成分治疗肝癌的作用靶点,通过Cytoscape软件构建“雷公藤多苷片-活性成分-靶点-肝癌”相互作用网络。运用String数据库对交集靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析,并使用Metascape数据库进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路和基因本体(GO)富集分析。借助AutoDockTools和PyMol软件对核心靶点及9种生物碱类成分进行分子对接验证。通过体外人肝癌HepG2细胞CCK-8实验验证TPT中9种生物碱的细胞毒作用。结果 经筛选得到TPT生物碱成分潜在作用靶点119个,肝癌疾病靶点1168个,交集靶点23个。经PPI分析筛选出10个关键靶点,包括EGFR、CASP3、HSP90AA1等,KEGG富集分析主要涉及通路有Pathways in cancer、Prostate cancer、PI3K-Akt signaling pathway等。GO富集发现TPT生物碱类成分促肝癌细胞凋亡与改变细胞形态和调节蛋白激酶活性有关。分子对接显示多种成分与多个关键靶点有较好的结合能力。细胞验证实验发现5种生物碱[雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤宁碱A、18-O-(3-糠酰)雷公藤春碱、peritassine A]对HepG2细胞均具有细胞毒性。结论 TPT中9种生物碱类成分可能通过作用于EGFR、CASP3、HSP90AA1等关键靶点和调节APAF1/CASP9/CASP3信号通路,从而降低肝癌细胞增殖、激活体内内在凋亡途径,最终促进肝癌细胞凋亡,具有潜在的抗肝癌活性。

**关键词:** 雷公藤多苷片; 生物碱; 网络药理学; 分子对接; HepG2细胞; 雷公藤晋碱; 雷公藤次碱; 雷公藤宁碱A; 18-O-(3-糠酰)雷公藤春碱; peritassine A

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)01-0017-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.01.003

Network pharmacology exploration and induction of liver cancer cell toxicity verification of alkaloids in *Tripterygium* Polyglycoside Tablet against liver cancerGONG He<sup>1</sup>, LUO Jiayi<sup>1</sup>, GAO Xue<sup>1</sup>, JI Ruifeng<sup>1</sup>, LIU Changxiao<sup>1, 2</sup>, HE Xin<sup>1</sup>

1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Tianjin Pharmaceutical Research Institute, Tianjin 300462, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of anti-liver cancer effects of alkaloidal components of *Tripterygium* Polyglycoside Tablet (TPT) based on network pharmacology combined with molecular docking technique and to validate the cytotoxicity-inducing effect of TPT alkaloidal components in liver cancer by cellular experiment. **Methods** The Swiss Target Prediction and Targetnet databases were used to predict the targets of nine alkaloidal components (wilforgine, wilforine, wilfortrine,

收稿日期: 2023-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82174209)

第一作者: 宫 贺, 硕士研究生。E-mail: gonghehg@163.com

\*共同通信作者: 刘昌孝, 中国工程院院士, 主要从事药理学与药动学研究。E-mail: liuchangxiao@vip.163.com

何 新, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理与中药药动学研究。E-mail: hexintn@163.com

wilfordine, wilforine A, triptonine B, euonymine, peritassine A, euonine) in TPT. The targets of liver cancer were retrieved from the Genecards, OMIM and TTD databases, and the targets of alkaloidal components for the treatment of liver cancer were obtained by inputting the two into the Venny online tool for intersection. The interaction network of "TPT-active ingredient-target-liver cancer" was constructed by Cytoscape software. Protein-protein interaction (PPI) network analysis of the intersecting targets was performed using the String database, and the enrichment analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) pathways was performed using the Metascape database. Molecular docking validation of the core targets and nine alkaloidal components was performed by using AutoDockTools and PyMol software. Verification of the cytotoxicity of nine alkaloids of TPT by CCK-8 assay in human liver cancer HepG2 cells *in vitro*. **Results** The screening yielded 119 potential targets of TPT alkaloidal components, 1 168 liver cancer disease targets, and 23 intersecting targets. The PPI analysis identified ten key targets, including EGFR, CASP3, HSP90AA1, etc. The KEGG enrichment analysis mainly involved Pathways in cancer, Prostate cancer, PI3K-Akt signaling pathway, etc. The GO enrichment revealed that the TPT alkaloidal components promote apoptosis in liver cancer cells was associated with alteration of cell morphology and regulation of protein kinase activity. The molecular docking showed that multiple components have good binding ability to multiple key targets. Cellular validation experiments showed that five alkaloids (wilforine, wilforine A, triptonine B, peritassine A) have cytotoxicity to HepG2 cells. **Conclusion** The nine alkaloidal components of TPT may act on key targets such as EGFR, CASP3, HSP90AA1 and modulate the APAF1/CASP9/CASP3 signaling pathway, thereby reducing cancer cell proliferation, activating the intrinsic apoptotic pathway *in vivo* and ultimately promoting apoptosis in liver cancer cells, having potential anti-liver cancer activity.

**Key words:** *Tripterygium* Polyglycoside Tablet; alkaloids; network pharmacology; molecular docking; HepG2 cells; wilforine; wilforine A; triptonine B; peritassine A

根据2020年《全球癌症统计》,肝癌已经成为全球第6大常见癌症,其致死率位居世界第3<sup>[1]</sup>。中国是肝癌高发国家,负担全球一半以上新发肝癌患者<sup>[2]</sup>,目前放射、化疗、移植和手术等治疗方法仍然是肝癌患者的最佳治疗手段,但现有治疗方法的副作用、术后并发症发生率以及复发风险较高<sup>[3-4]</sup>。因此亟需寻求新的肝癌治疗方案和有效天然药物成分来完善治疗手段。

雷公藤多苷片(*Tripterygium polyglycoside* Tablet, TPT)是目前应用最广泛的雷公藤制剂,具有抗炎、免疫抑制等作用,多用于治疗类风湿性关节炎、肾病综合征等<sup>[5-6]</sup>。自1936年首次从雷公藤根部分离得到萜类成分雷公藤红素后,目前已从雷公藤中分离得到100多种成分,主要包括生物碱类、二萜类、三萜类、倍半萜类及多糖等<sup>[7]</sup>。TPT中生物碱含量占比较高,约70%<sup>[8]</sup>。雷公藤生物碱能够抑制多种炎症通路,能够抑制血清及滑膜组织中炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、IL-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达<sup>[9-10]</sup>。研究表明,雷公藤生物碱中的单体成分peritassine A、雷公藤新碱具有抑制NO生成的作用<sup>[11]</sup>,雷公藤次碱、雷公藤定碱、雷公藤晋碱、雷公藤春碱、卫矛碱具有抗1型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)活性<sup>[12]</sup>,雷公藤宁碱A能够抑制IL-8、IL-2、IL-4和 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )等炎症因子的产生<sup>[13]</sup>,并且Li等<sup>[14]</sup>研究发现雷公藤春碱联合紫杉醇可通过抑制Bcl-2和增

强Bax的表达显著抑制肝癌HepG2细胞的增殖和侵袭。

本课题组前期研究发现<sup>[15]</sup>,TPT中生物碱类成分可作为评价该制剂疗效和毒性的质量标志物(Q-marker)成分。目前关于TPT生物碱类成分抗肝癌作用的研究较少,本研究采用网络药理学<sup>[16]</sup>结合分子对接技术,系统地预测TPT中9个主要生物碱类成分<sup>[17]</sup>与肝癌相关的潜在靶点和作用通路,通过研究雷公藤生物碱诱导HepG2细胞毒性的作用进一步评价其抗肝癌活性,为后续的药物开发与利用提供思路及理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人肝癌细胞HepG2来源于中国医学科学院肿瘤细胞库。

### 1.2 药品与试剂

雷公藤晋碱(wilforine,批号Wkq16092203,HPLC测定质量分数 $\geq 98\%$ )、雷公藤次碱(wilforine,批号Wkq16091004,HPLC测定质量分数 $\geq 98\%$ )、雷公藤春碱(wilfortine,批号Wkq151128,HPLC测定质量分数 $\geq 98\%$ )、雷公藤定碱(wilfordine,批号Wkq160127,HPLC测定质量分数 $\geq 98\%$ )、雷公藤宁碱A(wilforine A,批号Wkq17020907,HPLC测定质量分数 $\geq 97\%$ )、18-O-(3-糠酰)雷公藤春碱(triptonine B,批号

Wkq17020904, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$ )、卫矛碱(euonymine, 批号 Wkq17020905, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$ )、peritassine A (批号 Wkq17020906, HPLC 测定质量分数 $\geq 93\%$ )均购于维克奇生物科技有限公司;雷公藤新碱(euonine, 批号 T26J9Z53645, HPLC 测定质量分数 $\geq 95\%$ )购买于源叶生物科技有限公司;双氯芬酸钠(质量分数 $\geq 99\%$ )购自上海麦克林生化科技有限公司;DMEM 高糖培养基购自 Grand Island 生物公司;胎牛血清购自 Grand Island 生物公司;双抗(青霉素-链霉素)购自 Grand Island 生物公司;CCK-8 试剂购自美国 MedChemexpress 生物科技公司。

### 1.3 仪器

FlexStation 酶联免疫检测仪, 美国 Molecular Devices 公司; HERACELL150i 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, Thermo SCIENTIFIC 公司; 生物洁净工作台, AIR TECH 公司; ECLIPSE TE300 倒置式生物显微镜, Nikon 公司。

## 2 方法

### 2.1 TPT 生物碱类成分抗肝癌的网络药理学预测

**2.1.1 TPT 生物碱类成分作用靶点预测** 以市售的 9 种雷公藤生物碱[雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤春碱、雷公藤定碱、雷公藤宁碱 A、18-O-(3-糠酰)雷公藤春碱、卫矛碱、peritassine A、雷公藤新碱]作为 TPT 生物碱类的主要化学成分。首先利用 Pubchem 平台(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)获取 TPT 中 9 个生物碱成分对应的 Smiles 号, 以 Smiles 号为关键词在 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>)和 Targetnet 数据库(<http://targetnet.scbdd.com>)进行检索。在 SwissTargetPrediction 数据库中物种设置为 Homo sapiens, 选择排名前 15 的靶点; 在 Targetnet 数据库中选择 Prob>0 的靶点, 再用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>)转换基因名称。两者合并去重得到 TPT 生物碱成分的作用靶点。

**2.1.2 肝癌疾病靶点预测** 以“liver cancer”为关键词在 Genecards 数据库(<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库(<https://www.omim.org>)和 TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd>)中进行检索, 获取肝癌的相关疾病靶点。将 Genecards 数据库中 score>20 的靶点和 OMIM、TTD 数据库中检索到的全部靶点整合去除重复项, 即得到肝癌的相关疾病靶点。

**2.1.3 药物-活性成分-疾病-靶点相互作用网络构建** 利用 Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/>

venny)在线工具<sup>[18]</sup>绘制 TPT 生物碱成分作用靶点和肝癌相关靶点的韦恩图, 得到交集靶点, 即 TPT 治疗肝癌的作用靶点。运用 Cytoscape 3.9.1 软件将活性成分与作用靶点筛选结果导入, 进行网络可视化分析, 借助 Analyze Network 功能对网络进行拓扑学分析, 筛选出具有治疗作用的重要活性成分。

**2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析** 将筛选得到的 TPT 生物碱成分与肝癌的交集靶点基因名上传到 String 数据库(<https://string-db.org>), 限定物种为 Homo Sapiens, 构建 PPI 网络。借助 Cytoscape 软件的 Analyze Network 功能对网络进行拓扑学分析, 以大于平均度值(degree)为筛选条件, 选择 TPT 生物碱治疗肝癌的关键靶点。

**2.1.5 通路富集分析** 借助 Metascape 数据库(<https://metascape.org>)对 TPT 生物碱成分治疗肝癌的作用靶点进行基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。限定物种为 H. Sapiens, 进行 Custom Analysis, 在 Enrichment Analysis 工具栏下属列表中分别进行 KEGG pathway、GO molecular functions (MF)、GO biological processes (BP) 和 GO cellular components(CC)分析, 并下载相关通路富集数据。通过微信([www.bioinformatics.com.cn](http://www.bioinformatics.com.cn))在线工具对 KEGG 信号通路和 GO 功能富集分析数据进行可视化分析。

**2.1.6 分子对接验证** 在 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org>)下载关键靶点的蛋白晶体结构, 保存为 PDB 格式, 利用 PyMol2.5.0 软件将蛋白晶体结构去除水分子和原配体, 再使用 AutoDockTools1.5.7 软件加氢、加电荷, 保存为 PDBQT 格式文件。通过 Chem3D20.0.0.41 软件绘制 TPT 中 9 个生物碱的 3D 结构图, 保存为 SDF 格式, 使用 OpenBabel 3.1.1 软件将其转换为 MOL2 格式, 再用 AutoDockTools 软件转换为 PDBQT 格式。最后通过 AutoDockTools 软件中 Autogrid 和 Autodock 插件进行半柔性对接, PyMol 软件对结果进行可视化分析。

## 2.2 9 种生物碱成分体外对肝癌 HepG2 细胞活性的影响

**2.2.1 全培养基的配制** 在无菌条件下将 45 mL DMEM、5 mL 胎牛血清、0.5 mL 100×双抗(青霉素-链霉素)混合均匀, 培养基中二甲基亚砜(DMSO)体积分数<0.1%。

**2.2.2 受试药液的配制** 用含 10% FBS 新鲜培养

基将9种雷公藤生物碱的母液稀释为所需浓度的药物溶液。

**2.2.3 细胞培养及CCK-8检测** HepG2细胞以 $5 \times 10^4$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 密度进行种板,9种雷公藤生物碱母液用配制好的全培养基依次稀释成浓度为100、30、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的受试药液。双氯芬酸钠作为阳性对照采用同法进行稀释,同时设全培养基对照组。HepG2细胞种于96孔板后在37℃含5%  $\text{CO}_2$ 的孵箱中孵育48 h,吸出全培养基,加入100  $\mu\text{L}$ 各浓度的雷公藤生物碱受试药液或双氯芬酸钠,在37℃含5%  $\text{CO}_2$ 的孵箱中孵育20 h。吸出全培养基,加入100  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液(CCK-8用全培养基稀释10倍),在37℃含5%  $\text{CO}_2$ 的孵箱中孵育1.5 h。采用酶标仪检测450 nm处吸光度( $A$ )值,计算细胞存活率。在SPSS 27.0.1中使用单因素方差分析进行统计比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

$$\text{存活率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}}$$

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学结果

**3.1.1 TPT生物碱成分与肝癌相关靶点的挖掘** 通过Smiles号检索Swisstarget和Targetnet数据库共筛选得到119个TPT 9个生物碱成分的作用靶点。通过检索主题词“liver cancer”在Genecards、OMIM和TTD数据库共筛选得到1168个肝癌相关的疾病靶点。将上述数据利用Venny图交集得到23个靶点,见图1。

**3.1.2 “药物-活性成分-疾病-靶点”网络分析** 将9个活性成分和23个交集靶点导入Cytoscape软件,构建“雷公藤多苷片-活性成分-靶点-肝癌”相互作用网络图(图2)。得到了1个包括34个节点和99条边的网络,其中度值较高排名靠前的活性成分为

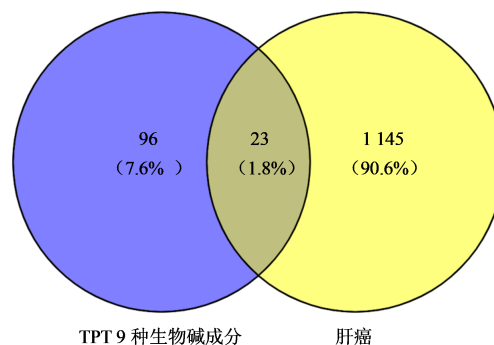


图1 化合物靶点和疾病靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of compound targets and disease targets

peritassine A、雷公藤次碱和卫矛碱,可能是发挥肝癌治疗作用的关键成分。

**3.1.3 PPI网络分析与关键靶点筛选** 将成分与疾病的23个交集靶点导入String数据库进行PPI网络分析,利用Cytoscape软件绘制PPI网络图(图3),其中包含22个节点和100条边。度值越大,节点越大,颜色越深,蛋白质间相互关系越密切。以大于度值平均值为筛选条件,共选出10个关键靶点,见表1。

**3.1.4 KEGG信号通路和GO通路富集分析** 将23个交集靶点通过Metascape数据库进行KEGG信号和GO通路富集分析,并利用微生信在线工具绘制通路富集图,见图4。KEGG通路富集分析中主要涉及的通路有pathways in cancer、prostate cancer、PI3K-Akt signaling pathway等通路,利用KEGG Database对pathways in cancer通路进行解读,见图5。GO富集分析结果显示,BP分析主要包括细胞对有机环状化合物的反应(cellular response to organic cyclic compound)、细胞形态发生(cell morphogenesis)

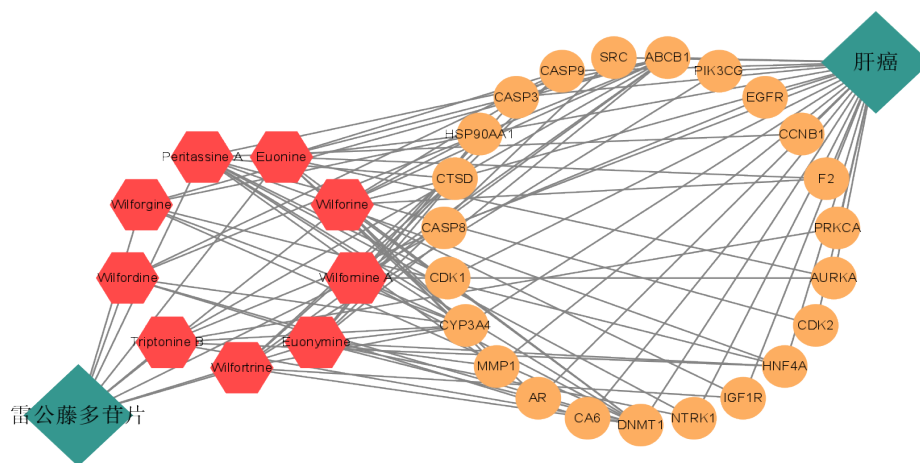


图2 药物-活性成分-疾病-靶点相互作用网络

Fig. 2 Network of drug-active ingredient-disease-target interaction

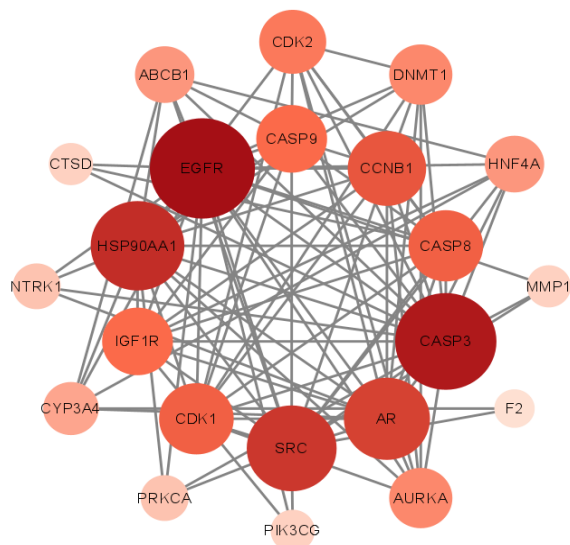


图 3 PPI 网络

Fig. 3 Protein-protein interaction network

表 1 10 个关键靶点信息

Table 1 Information of ten key targets

| 靶点名称     | 蛋白全称                                       |
|----------|--------------------------------------------|
| EGFR     | Epidermal growth factor receptor           |
| CASP3    | Caspase-3                                  |
| HSP90AA1 | Heat shock protein HSP 90-alpha            |
| SRC      | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src |
| AR       | Androgen receptor                          |
| CCNB1    | G2/mitotic-specific cyclin-B1              |
| CASP8    | Caspase-8                                  |
| CDK1     | Cyclin-dependent kinase 1                  |
| CASP9    | Caspase-9                                  |
| IGF1R    | Insulin-like growth factor 1 receptor      |

等;CC 分析主要包括膜筏(membrane raft)、膜微结构域(membrane microdomain)等;MF 分析主要包括蛋白激酶活性(protein kinase activity)、磷酸转移酶活性,醇基为受体(phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor)等。

**3.1.5 分子对接验证结果** 将PPI网络分析中筛选出的10个关键靶点分别与9个生物碱成分进行分子对接,对接结合能数据和蛋白质 PDB ID 见图6。分子对接最低结合能越小,分子与蛋白结合越好,当结合能 $\leq -20.92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ( $-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )时判定结合较为稳定。由图6可知,9个生物碱成分与关键靶点间总体结合较稳定,其中化合物雷公藤次碱与CCNB1和化合物雷公藤新碱与EGFR、AR、CASP9的对接结合稳定性较好,通过PyMol软件进行可视化分析,分子蛋白对接模拟图见图7。

### 3.2 9种生物碱对HepG2细胞活性的影响

由图8可知,与对照组比较,100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的双氯芬酸钠组细胞存活率显著降低( $P<0.05$ ),300  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 双氯芬酸钠组的细胞存活率下降并具有非常显著性差异( $P<0.01$ ),说明实验系统稳定可靠,结果可信。

9种生物碱的CCK-8实验结果见图9,其中雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤宁碱A、18-O-(3-糠酰)雷公藤春碱、peritassine A 5种雷公藤生物碱均具有细胞毒性,各细胞存活率较对照组具有不同程度的下降趋势,并具有显著性差异( $P<0.01$ )。

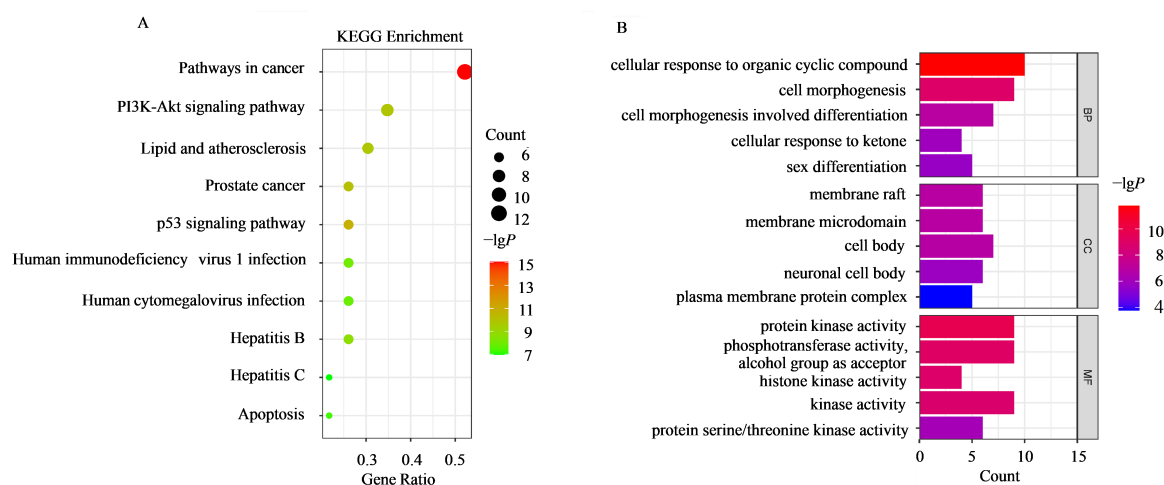


图 4 KEGG 信号通路(A)和GO功能(B)富集分析

Fig. 4 KEGG signaling pathway (A) and GO function (B) enrichment analysis

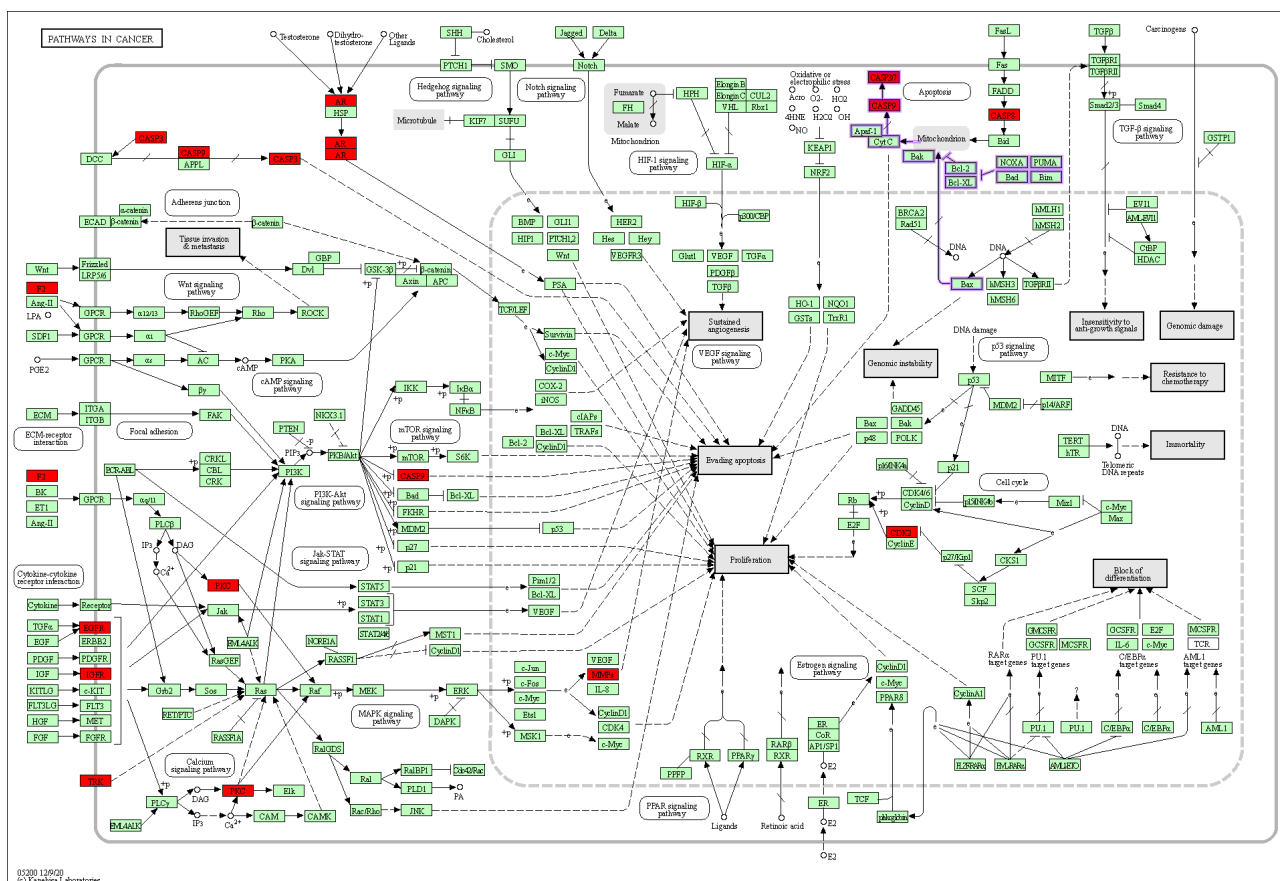


图5 化合物作用靶点与 pathways in cancer 通路

Fig. 5 Targets of compounds and pathways in cancer

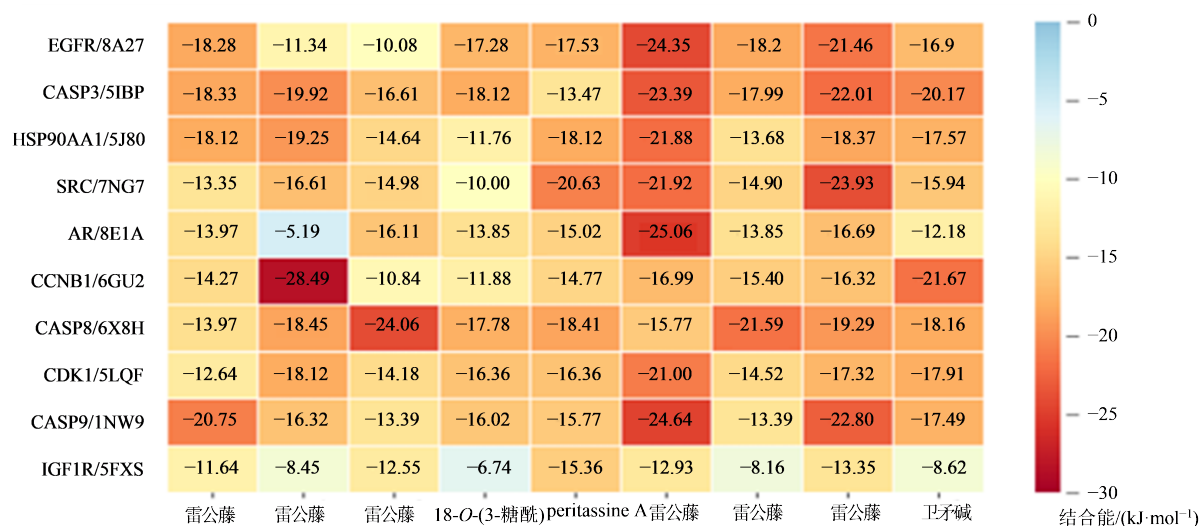


图6 分子对接最低结合能热图

Fig. 6 Heat map of molecular docking minimum binding energy

#### 4 讨论

本研究采用网络药理学结合分子对接技术,整体探究了TPT中主要生物碱类成分与肝癌相关的作用靶点和潜在通路,共挖掘出23个TPT治疗肝癌的作用靶点,通过构建PPI网络从中筛选出10个关

键靶点,包括EGFR、CASP3、HSP90AA1、SRC、AR等。其中,表皮生长因子受体(EGFR)作为一种跨膜蛋白受体,在肿瘤的发生和发展中起着主导作用<sup>[19-20]</sup>,目前已被确定为从早期炎症和肝细胞增殖到纤维形成与肿瘤转化各个阶段的肝脏损伤反应

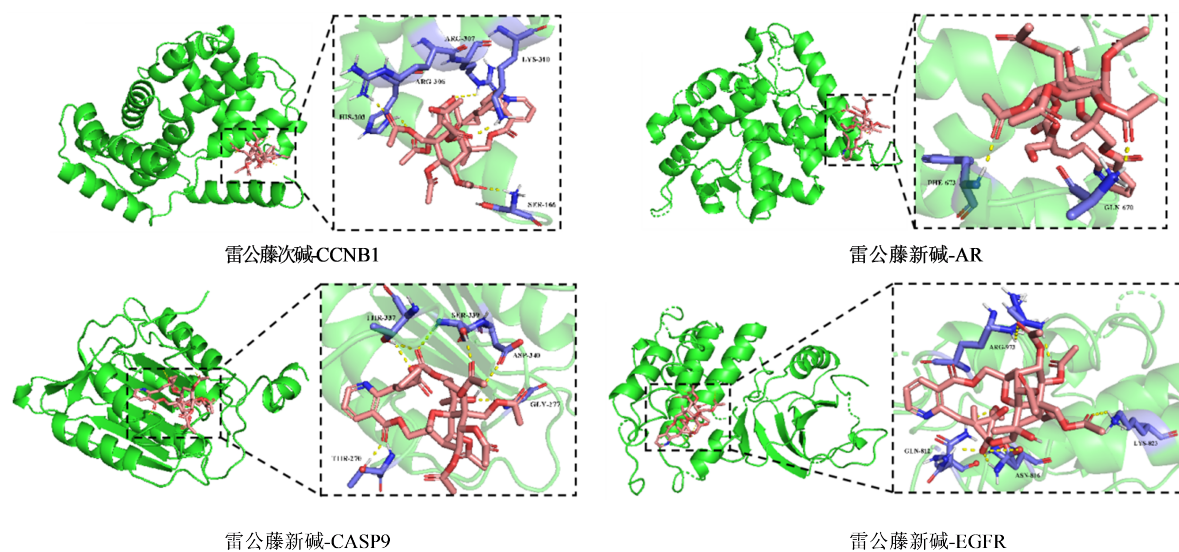
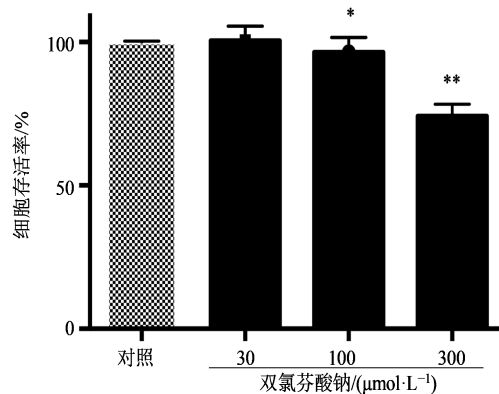
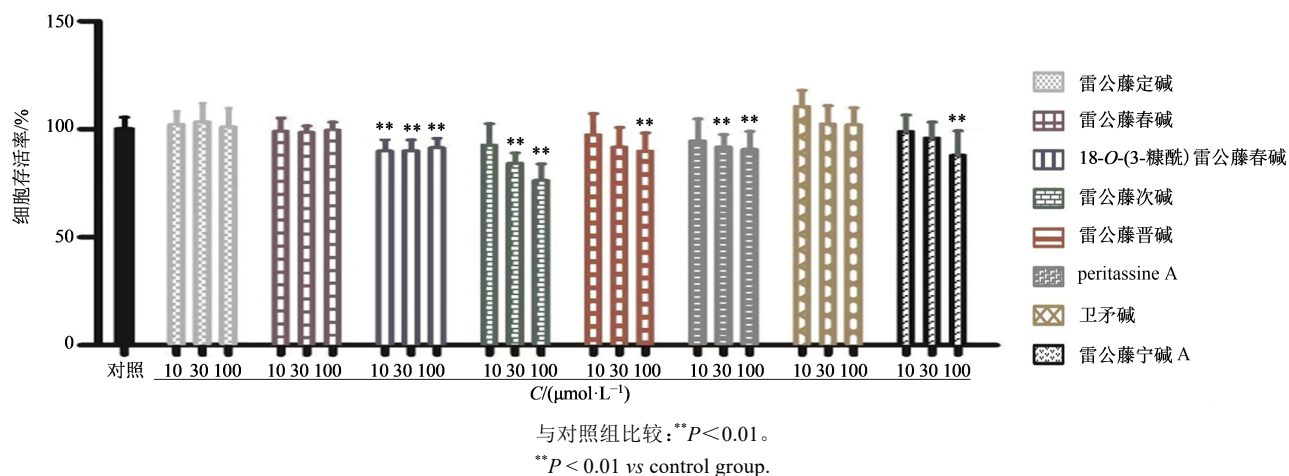


图 7 分子蛋白对接模拟图

Fig. 7 Simulation diagram of molecular protein docking

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group.图 8 双氯芬酸钠对 HepG2 细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )Fig. 8 Effect of diclofenac sodium on HepG2 cell survival rate ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

的关键角色,且在大多数的肝癌细胞系中高表达<sup>[21-22]</sup>。大量研究发现,热休克蛋白 90  $\alpha$  家族 A 类成员 1 (HSP90AA1) 调控的许多受体蛋白是肿瘤发病过程中的原癌基因产物或重要信号转导因子,与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[23]</sup>, Chen 等<sup>[24]</sup>发现,在肝癌患者血清中 HSP90AA1 水平远高于健康对照组,且可以促进糖酵解和增殖,减少细胞凋亡,从而促进肝癌细胞的生长<sup>[25]</sup>。原癌基因酪氨酸蛋白激酶 SRC 作为最古老的致癌基因,是一种非受体酪氨酸激酶,当其被激活时,参与细胞增殖、存活、迁移和血管生成<sup>[26]</sup>,是多种信号通路的关键组成部分,与肿瘤的发展密切相关<sup>[27]</sup>, Elsberger 等<sup>[28]</sup>研究发现 Src 过表达或激活时可转化细胞并诱导肿瘤的形成。肝脏作为重要的代谢器官,同时也是性激素的

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ 。\*\* $P < 0.01$  vs control group.图 9 雷公藤生物碱对 HepG2 细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )Fig. 9 Effect of *Tripterygium wilfordii* alkaloids on HepG2 cells survival rate ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

靶器官, Ren等<sup>[29]</sup>研究证实雄激素受体(AR)是肝脏脂肪变性和肿瘤发生的驱动因素, 同时也会促进细胞周期进展、增加细胞氧化应激、抑制自然杀伤细胞(NK)细胞毒性等, 从而促进肝癌的发展<sup>[30]</sup>, 当AR-雄激素复合体内化到肝细胞时, 它与细胞核和病毒ARE序列结合, 从而激活HBV基因组的转录和HBV X(HBx)蛋白的产生, 该蛋白通过激活Src激酶促进AR的二聚, 增强AR的转录活性, 从而形成促进肝癌发生的反馈回路, 造成了一种“恶性循环”<sup>[31]</sup>。这提示TPT中生物碱类成分治疗肝癌的机制可能与抑制促癌靶点的过表达或激活, 降低癌细胞的增殖与存活, 促进肿瘤细胞凋亡有关。

通过KEGG信号通路富集分析发现, Pathways in cancer 通路与TPT治疗肝癌最为相关。以APAF1(凋亡蛋白酶激活因子1)为起始靶点的APAF1/CASP9/CASP3信号通路, 可能是TPT发挥治疗作用的重要通路。作为体内重要的内在凋亡途径, 这一途径的中心是线粒体, 它在膜间空间(IMS)中隐藏着细胞色素C<sup>[32]</sup>, 当其释放到细胞质后会与APAF1结合, 激活启动型半胱天冬酶Caspase-9, 并进一步激活效应型半胱天冬酶Caspase-3, 最终激活蛋白水解导致蛋白底物断裂促进细胞凋亡<sup>[33-34]</sup>。同时TPT也会作用于Caspase-8, 作为启动型半胱天冬酶, Caspase-8介导的BH3-单一蛋白BID的激活被视为一种放大机制, 可以直接裂解并激活Caspase-3, 进一步放大蛋白水解反应、扩增凋亡信号, 促进肝癌细胞死亡<sup>[35-36]</sup>。

本研究运用网络药理学的方法, 筛选得到雷公藤生物碱类成分与肝癌相关的关键靶点和作用通路, 并利用分子对接与细胞实验, 验证了雷公藤生物碱成分对肝癌细胞具有细胞毒活性。发现TPT中生物碱类成分可能通过作用于EGFR、CASP3、HSP90AA1、SRC、AR等关键靶点, 干预APAF1/CASP9/CASP3信号通路, 从而降低癌细胞增殖、激活体内内在凋亡途径, 最终促进肝癌细胞凋亡, 具有潜在的抗肝癌活性, 值得进行深入的药效作用及机制探讨研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 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: A Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Shi J F, Cao M M, Wang Y T, et al. Is it possible to halve the incidence of liver cancer in China by 2050? [J]. Int J Cancer, 2021, 148(5): 1051-1065.
- [3] Anwanwan D, Singh S K, Singh S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer, 2020, 1873(1): 188314.
- [4] Gravit L. Liver cancer [J]. Nature, 2014, 516(7529): S1.
- [5] 刘冰, 袁红亮, 汪洪波, 等. 雷公藤多苷片联合依那西普治疗类风湿性关节炎的疗效及其对血清14-3-3 $\eta$ 蛋白、抗环瓜氨酸肽抗体水平的影响 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(3): 561-565.
- [6] Liu B, Yuan H L, Wang H B, et al. Efficacy of Tripterygium Glycosides Tablets combined with etanercept in treatment of rheumatoid arthritis and its effect on serum 14-3-3 $\eta$  protein and anti-CCP levels [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(3): 561-565.
- [7] 蔡思铭, 岑红霞, 廖赵妹, 等. 雷公藤多苷片联合泼尼松治疗儿童自身免疫性肝炎的临床研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 398-402.
- [8] Cai S M, Cen H X, Liao Z M, et al. Clinical study of Tripterygium Glycosides Tablets combined with prednisone in treatment of children with autoimmune hepatitis [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(2): 398-402.
- [9] 闫建功, 王一竹, 吴先富等. 雷公藤中倍半萜生物碱类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2022, 53(07): 1933-1938.
- [10] Yan J G, Wang Y Z, Wu X F, et al. Chemical constituents of sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii* [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2022, 53(07): 1933-1938.
- [11] Qu L, Xiao Y, Jia Z X, et al. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry for chemical constituents analysis of tripterygium glycosides tablets [J]. J Chromatogr A, 2015, 1400: 65-73.
- [12] Gao C, Huang X X, Bai M, et al. Anti-inflammatory sesquiterpene pyridine alkaloids from *Tripterygium wilfordii* [J]. Fitoterapia, 2015, 105: 49-54.
- [13] Zhang Y Q, Xu W, Li H, et al. Therapeutic effects of total alkaloids of *Tripterygium wilfordii* Hook f. on collagen-induced arthritis in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(3): 699-705.
- [14] Wang C, Li C J, Yang J Z, et al. Anti-inflammatory sesquiterpene derivatives from the leaves of *Tripterygium wilfordii* [J]. J Nat Prod, 2013, 76(1): 85-90.
- [15] Horiuchi M, Murakami C, Fukamiya N, et al. Tripterydine A-C, sesquiterpene pyridine alkaloids from *Tripterygium wilfordii*, and structure anti-HIV activity relationships of *Tripterygium* alkaloids [J]. J Nat Prod, 2006, 69(9): 1271-1274.
- [16] Duan H, Takaishi Y, Momota H, et al.

- Immunosuppressive sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii* [J]. J Nat Prod, 2001, 64(5): 582-587.
- [14] Li S Z, Zheng L. Effect of combined treatment using wilfortrine and paclitaxel in liver cancer and related mechanism [J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 1109-1114.
- [15] Gao X, Du X, An L J, et al. Wilfortrine, the Q-marker and PK-maker of *Tripterygium glycosides* tablet: Based on preparation quantitative analysis and PK-PD study [J]. Phytomedicine, 2019, 54: 357-364.
- [16] 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.
- Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [17] Du X, Nyagblordzro M, An L J, et al. Pharmacokinetic and toxicological characteristics of tripterygium glycosides and their derivatives [J]. Curr Drug Metab, 2018, 19(7): 605-627.
- [18] 黄博宁, 林娟, 彭思远, 等. 基于网络药理学探讨丹红化瘀口服液治疗深静脉血栓的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1652-1662.
- Huang B N, Lin J, Peng S Y, et al. Mechanism of Danhong Huayu Oral Liquid in treatment of deep vein thrombosis based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(6): 1652-1662.
- [19] Zhang H Y, Deng T, Liu R, et al. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15016.
- [20] Zhou Q Q, Huang T T, Jiang Z Y, et al. Upregulation of SNX5 predicts poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma progression by modulating the EGFR-ERK1/2 signaling pathway [J]. Oncogene, 2020, 39(10): 2140-2155.
- [21] Berasain C, Avila M A. The EGFR signalling system in the liver: From hepatoprotection to hepatocarcinogenesis [J]. J Gastroenterol, 2014, 49(1): 9-23.
- [22] Jin H J, Shi Y P, Lv Y Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib [J]. Nature, 2021, 595(7869): 730-734.
- [23] Shi W D, Feng L Y, Dong S, et al. FBXL6 governs c-MYC to promote hepatocellular carcinoma through ubiquitination and stabilization of HSP90AA1 [J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 100.
- [24] Chen W, Li G H, Peng J J, et al. Transcriptomic analysis reveals that heat shock protein 90 $\alpha$  is a potential diagnostic and prognostic biomarker for cancer [J]. Eur J Cancer Prev, 2019, 29(4): 357-364.
- [25] Xu Q R, Tu J F, Dou C W, et al. HSP90 promotes cell glycolysis, proliferation and inhibits apoptosis by regulating PKM2 abundance via Thr-328 phosphorylation in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 178.
- [26] Aleshin A, Finn R S. SRC: A century of science brought to the clinic [J]. Neoplasia, 2010, 12(8): 599-607.
- [27] Okuzaki D, Yamauchi T, Mitani F, et al. C-Src promotes tumor progression through downregulation of microRNA-129-1-3p [J]. Cancer Sci, 2020, 111(2): 418-428.
- [28] Elsberger B, Stewart B, Tatarov O, et al. Is src a viable target for treating solid tumours? [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2010, 10(7): 683-694.
- [29] Ren Q N, Zhang H, Sun C Y, et al. Phosphorylation of androgen receptor by mTORC1 promotes liver steatosis and tumorigenesis [J]. Hepatology, 2022, 75(5): 1123-1138.
- [30] Zhou H C, Liu C X, Pan W D, et al. Dual and opposing roles of the androgen receptor in VETC-dependent and invasion-dependent metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2021, 75(4): 900-911.
- [31] Kur P, Kolasa-Wołoskiuk A, Misiakiewicz-Has K, et al. Sex hormone-dependent physiology and diseases of liver [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(8): 2620.
- [32] Kalkavan H, Chen M J, Crawford J C, et al. Sublethal cytochrome c release generates drug-tolerant persister cells [J]. Cell, 2022, 185(18): 3356-3374.e22.
- [33] Tait S W G, Green D R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(9): 621-632.
- [34] Vucic D, Dixit V M, Wertz I E. Ubiquitylation in apoptosis: A post-translational modification at the edge of life and death [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(7): 439-452.
- [35] Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 189-200.
- [36] Wang X M, Wei K L, Zhang Q G, et al. Expression of cluster of differentiation-95 and relevant signaling molecules in liver cancer [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5): 3375-3381.

[责任编辑 刘东博]