

基于生物信息学结合实验验证的常春藤皂苷元抗肝癌机制研究

崔文超¹, 刘明远¹, 关宝生², 曾佳², 田亚妮¹, 邓仲修², 白雪^{1*}

1. 佳木斯大学基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154007

2. 佳木斯大学公共卫生学院, 黑龙江 佳木斯 154007

摘要: **目的** 应用生物信息学与实验相结合的方法, 分析常春藤皂苷元 (hederagenin, HD) 抗肝癌的作用机制。 **方法** 通过 UCSC Xena 数据库获取肝癌 RNA-seq 数据, 应用 R 软件“Limma”包筛选肝癌差异基因, SwissTargetPrediction 数据库预测 HD 作用靶点, 取二者交集基因, String 数据库构建交集基因的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, Cytoscape 3.9.0 软件筛选 PPI 网络中核心基因, 采用分子对接方法验证 HD 与核心基因的结合位点。采用 MTT 法观察 HD 对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响; 采用 Western blotting 法检测 HD 对 HepG2 细胞和 H22 荷瘤小鼠模型瘤体内细胞分裂周期因子 25A (cell division cycle 25A, CDC25A)、CDC25B、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、雄性激素受体 (androgen receptor, AR)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1) 和前列腺素内过氧化物酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 蛋白表达的影响。 **结果** 生物信息学分析显示, HD 可能作用于 IL-6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B 和 ESR1, 从而发挥抗肝癌作用。HD 显著抑制 HepG2 细胞增殖 ($P < 0.05$ 、 0.01), 下调 HepG2 细胞和瘤体 IL-6、CDC25A、ESR1 和 PTGS2 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 上调 AR 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 下调瘤体 CDC25B 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。 **结论** HD 能够通过调控 IL-6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B 和 ESR1, 进而发挥抗肝癌的作用。

关键词: 常春藤皂苷元; 肝癌; 生物信息学; 白细胞介素-6; 细胞分裂周期因子 25A; 前列腺素内过氧化物酶 2; 雄性激素受体; 细胞分裂周期因子 25B; 雌激素受体 1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)12-3704-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.016

Mechanism of hederagenin on hepatocellular carcinoma based on bioinformatics and experimental validation

CUI Wen-chao¹, LIU Ming-yuan¹, GUAN Bao-sheng², ZENG Jia², TIAN Ya-ni¹, DENG Zhong-xiu², BAI Xue¹

1. School of Basic Medical, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

2. School of Public Health, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

Abstract: Objective To analyze the mechanism of anti-hepatocellular carcinoma effect of hederagenin based on bioinformatics combined with experiments. **Methods** UCSC Xena database was used to download RNA-seq data of hepatocellular carcinoma, R software “Limma” package was used to screen hepatocellular carcinoma differential genes. SwissTargetPrediction database was used to predict hederagenin target genes. Intersecting genes were screened between hepatocellular carcinoma differential genes and hederagenin target genes. String database was used to construct protein-protein interaction (PPI) network of intersecting genes, Cytoscape_3.9.0 was used to screen core genes in PPI network, and molecular docking was used to analyze the binding sites of hederagenin with core genes. MTT assay was used to detect the effect of hederagenin on proliferation of HepG2 cells; Western blotting was used to detect effect of hederagenin on cell division cycle 25A (CDC25A), CDC25B, interleukin-6 (IL-6), androgen receptor (AR), estrogen receptor 1 (ESR1) and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) protein expressions in HepG2 cells and tumor of H22 tumor-bearing mice model. **Results** Bioinformatics analysis showed that hederagenin may act on IL-6, CDC25A, PTGS2, AR, CDC25B and ESR1 to treat hepatocellular carcinoma. Hederagenin significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells ($P < 0.05$, 0.01), down-regulated IL-6, CDC25A, ESR1 and PTGS2 protein expression levels in HepG2 cells and tumors ($P < 0.01$), up-regulated

收稿日期: 2022-02-23

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (YQ2020H001); 黑龙江省教育科学“十三五”规划课题 (GBD1317135)

作者简介: 崔文超 (1994—), 男, 硕士, 研究方向为中药抗癌机制研究。Tel: 18324543958 E-mail: 3410177398@qq.com

*通信作者: 白雪, 硕士生导师, 副教授, 主要从事中药抗肿瘤和痛风病因学研究。E-mail: baixue19820526@163.com

AR protein expression level ($P < 0.01$), down-regulated CDC25B protein expression level in tumor ($P < 0.01$). **Conclusion** HD may exert anti-hepatocellular carcinogenic effect by regulating IL-6, CDC25A, PTGS2, AR, CDC25B and ESR1.

Key words: hederagenin; hepatocellular carcinoma; bioinformatics; interleukin-6; cell division cycle 25A; prostaglandin endoperoxide synthase 2; androgen receptor; cell division cycle 25B; estrogen receptor 1

肝癌是世界上最常见的癌症之一，其死亡原因大多以转移为主^[1]。肝癌的主要危险因素是慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染，且由于肝癌复发率较高，患者的生存率普遍很低^[2-3]。因此，探寻一种针对肝癌行之有效的治疗药物至关重要。常春藤皂苷元 (hederagenin, HD) 最初主要从五加科常春藤属植物中华常春藤 *Hedera nepalensis* K. Koch var. *sinensis* (Tobl.) Rehd. 中提取出来。研究显示，HD 在体外和体内具有抗癌^[4]、抗炎^[5]和抗动脉硬化^[6]的活性。本课题组多年来一直致力于 HD 的抗肝癌作用研究，前期研究显示，HD 通过线粒体途径和死亡受体途径在体内发挥抗肝癌作用^[7]。因此，在前期工作基础上，本研究应用生物信息学与实验相结合的方法，进一步分析常春藤皂苷元抗肝癌的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

人肝癌 HepG2 细胞购自中国医学科学院肿瘤医院研究所细胞库。

1.2 药品与试剂

HD (批号 465-99-6, 质量分数为 99%) 购自成都瑞芬思生物技术有限公司; DMEM 培养基 (批号 2203194) 购自美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶 (批号 C0201-100 mL)、Western 及 IP 细胞裂解液 (批号 P0013) 和 RIPA 强裂解液 (批号 P0013B) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清 (批号 20120703) 购自浙江天杭生物科技股份有限公司; PVDF 膜 (批号 46273700) 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; BCA 试剂盒 (批号 MA0082-2-Aug-20G)、ECL 发光液 (批号 MA0186-Apr-29G)、MTT 细胞增殖及细胞毒性试剂盒 (批号 MB4698-1) 购自大连美仑生物技术有限公司; 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 抗体 (批号 WL02841)、细胞分裂周期蛋白 25A (cell division cycle 25A, CDC25A) 抗体 (批号 WL04650)、CDC25B 抗体 (批号 WL02958)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1) 抗体 (批号 WL00940)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2,

PTGS2) 抗体 (批号 WL01750)、雄性激素受体 (androgen receptor, AR) 抗体 (批号 WL00223) 购自万类生物科技有限公司; β -actin 抗体 (批号 AC-15)、HRP 标记的羊抗兔二抗 (批号 BA1039) 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器

全自动多功能酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司), 电泳仪 (德国 Biometra 公司); 激光近红外成像仪 (美国 Azure Biosystems 公司); 5804R 型多功能离心机 (德国 Eppendorf 公司); CO₂ 细胞恒温培养箱 (赛默飞世尔科技有限公司)。

2 方法

2.1 生物信息学分析

2.1.1 鉴定 HD/肝癌交集基因 通过 UCSC Xena 网站获取肝癌患者的高通量 RNA-seq 数据, 基因表达谱通过归一化和基于 log₂ 转化进行定量。之后, 通过 R 软件中的 “Limma” 包对肝癌高通量 RNA-seq 数据进行差异基因筛选。差异基因筛选标准: log₂ 转换倍数变化 (FC) 的绝对值 ≥ 1 且校正后的 P 值 (P_{adj}) < 0.05 。通过 SwissTargetPrediction 数据库检索 HD 作用靶点, 对肝癌差异基因和 HD 作用靶点进行比对, 以获得二者的交集基因。最后使用 Uniprot 数据库中的审查 (Swiss-Prot) 确定最终候选的交集基因。

2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 的构建及其核心基因分析 使用 String 数据库下载 HD/肝癌交集基因的 PPI 数据, 后将数据以 txt 文档格式输入 Cytoscape_3.9.0 软件中, 使用 Cytoscape_3.9.0 软件中的 Cytohubba 插件根据节点度值大小筛选前 8 个核心基因。

2.1.3 分子对接 通过 PubChem 数据库获取 HD 的分子结构, PDB 数据库获取 IL-6、CDC25A 和 PTGS2 蛋白的 3D 结构, 使用 ChemBioOffice 软件中的 ChemBio3D 绘图模块对 HD 药物结构进行力场优化, 使用 Autodock Vina 软件的辅助工具 MGLTools 1.5.6 对 IL-6、CDC25A 和 PTGS2 蛋白进行处理和氢化, 将原始的蛋白 pdb 文件格式转换为 Autodock Vina 程序认可的 pdbqt 格式。此外, 通过 Autodock

Vina 软件中的网格盒功能,在合理设置对接参数的情况下,根据均方根差(root-mean-square deviation, RMSD)筛选最佳 HD 结合位点。Pymol 软件绘制 HD 与 IL-6、CDC25A 和 PTGS2 蛋白的结合位点。

2.2 实验验证

2.2.1 HD 对 HepG2 细胞增殖的影响 将 HepG2 细胞以 5000 个/孔接种至 96 孔板中,在培养箱中培养 24 h 后,分别给予 30、60、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HD 处理 HepG2 细胞 24、48 h,对照组加入不含药物的培养基。每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h;加入 150 μL 二甲基亚砷终止孵育,使用酶标仪测定各孔在 570 nm 处的吸光度(A)值。

2.2.2 HD 对 HepG2 细胞形态的影响 在 6 孔板内放入细胞爬片,将 HepG2 细胞以 5×10^5 个/mL 接种至 6 孔板中,在细胞培养箱中孵育,待细胞融合度达到 80%以上,分别给予 30、60、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HD 处理 24 h,干预 24 h 后取出爬片,固定后进行苏木素-伊红(HE)染色,于光学显微镜下观察并拍照。

2.2.3 Western blotting 法检测 CDC25A、CDC25B、IL6、AR、ESR1 和 PTGS2 蛋白表达

(1) HD 对 HepG2 细胞 CDC25A、CDC25B、IL-6、AR、ESR1 和 PTGS2 蛋白表达的影响 收集 HD 干预 24 h 后 HepG2 细胞,加入 Western 及 IP 细胞裂解液提取总蛋白,使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂牛奶封闭后,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h,使用 ECL 化学发光试剂盒显影,采用 Image J 软件进行分析。

(2) HD 对 H₂₂ 荷瘤小鼠瘤体组织 CDC25A、CDC25B、IL-6、AR、ESR1 和 PTGS2 蛋白表达的影响 取本课题组前期研究^[7]中对照组、环磷酰胺(25 mg/kg)组和 HD(100、200、400 mg/kg)组的 H₂₂ 荷瘤小鼠瘤体组织,剪碎后加入 RIPA 强裂解液提取总蛋白。采用 Western blotting 法检测瘤体组织 CDC25A、CDC25B、IL-6、AR、ESR1 和 PTGS2 蛋白表达情况。

2.3 统计分析

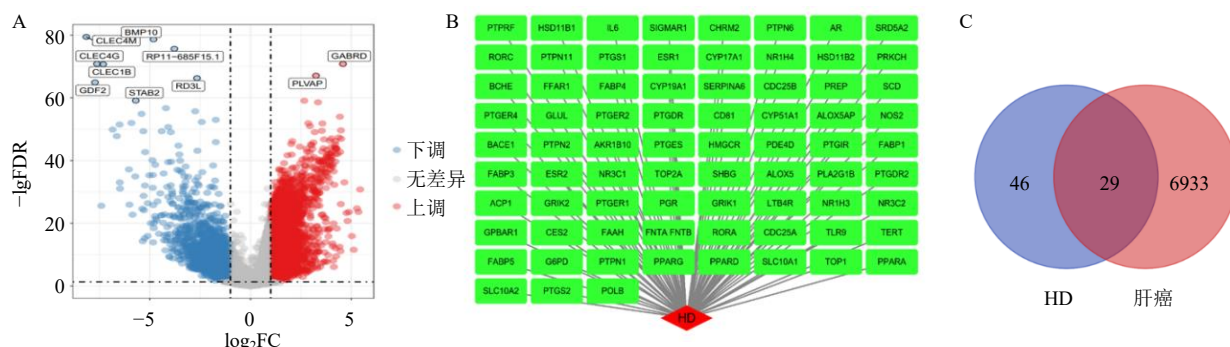
采用 R 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件(GraphPad Software Inc)进行绘图和分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组独立样本采用 t 检验分析,多组样本采用 One-away ANOVA 分析。

3 结果

3.1 生物信息学分析

3.1.1 HD/肝癌交集基因的鉴定 如图 1-A 所示,通过 R 软件“Limma”包筛选得到了 6962 个肝癌相关的差异基因。如图 1-B 所示,经 SwissTargetPrediction 数据库中预测发现 75 个 HD 的潜在作用靶点。如图 1-C 所示,对 2 个基因集进行比较,发现了 29 个 HD/肝癌交集基因。

3.1.2 PPI 网络构建及核心基因分析 如图 2-A 所示,使用 String 数据库构建了 HD/肝癌交集基因的 PPI 网络。如图 2-B 所示,通过使用 Cytoscape_3.9.0 软件中的 Cytohubba 插件筛选了 PPI 网络中前 8 个核心基因,分别为 AR、ESR1、PTGS2、IL-6、孕酮受体(progesterone receptor, PGR)、性激素结合球蛋白(sex hormone-binding globulin, SHBG)、细胞色素 P450 酶 17A1(cytochrome p450 family 17A1, CYP17A1)和 CYP19A1。



A-肝癌中的差异基因 B-HD 预测靶基因 C-HD/肝癌交集基因的 Venn 图
A-differential genes in hepatocellular carcinoma B-HD predicted target genes C-Venn diagram of HD/hepatocellular carcinoma intersecting genes

图 1 HD/肝癌交集基因的鉴定

Fig. 1 Identification of HD/hepatocellular carcinoma crossover genes

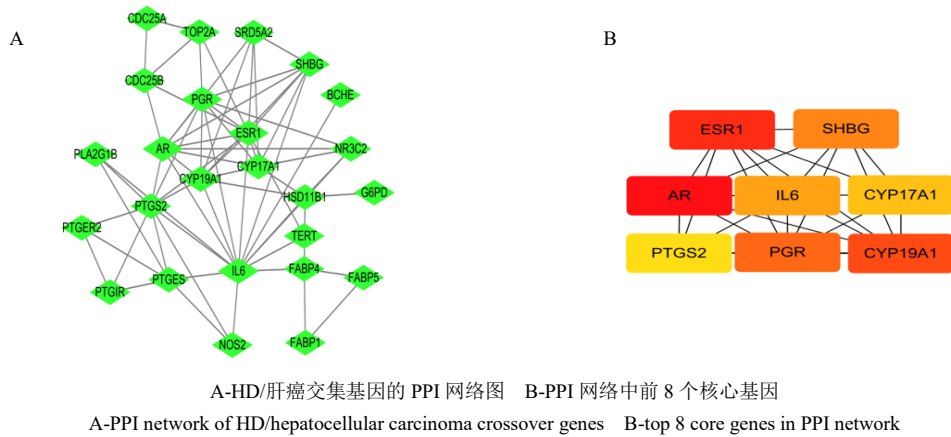


图 2 HD/肝癌交集基因 PPI 网络图中核心基因的鉴定

Fig. 2 Identification of core genes in PPI network of HD/hepatocellular carcinoma crossover genes

3.1.3 分子对接 采用分子对接预测了 HD 与 IL-6、CDC25A 和 PTGS2 蛋白的结合位点。如图 3 所示，HD 分别与 IL-6 蛋白上 65 号位的 LYS 氨基酸残基、CDC25A 蛋白 379 号位 PHE 氨基酸残基、PTGS2 蛋白 34 号与 133 号 ASN 和 ASP 氨基酸残基形成氢键。

3.2 实验验证

3.2.1 HD 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 本课题组前期通过 Hoechst 33342 荧光单染、AO/EB 荧光

双染和 Annexin V-FITC 染色已证实 HD 诱导 HepG2 细胞的凋亡^[7]。本研究通过使用 MTT 法检测不同质量浓度 (30、60、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) HD 干预后 HepG2 细胞的增殖情况，如图 4-A 所示，与对照组 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 相比，各给药组细胞活力显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，且呈剂量和时间相关性。使用 HE 染色法检测不同质量浓度 (30、60、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) HD 干预后 HepG2 细胞的形态变化，如图 4-B 所示，与对照组相比，HD 组细胞密度呈降低趋势，细胞膜与核膜出现皱缩。

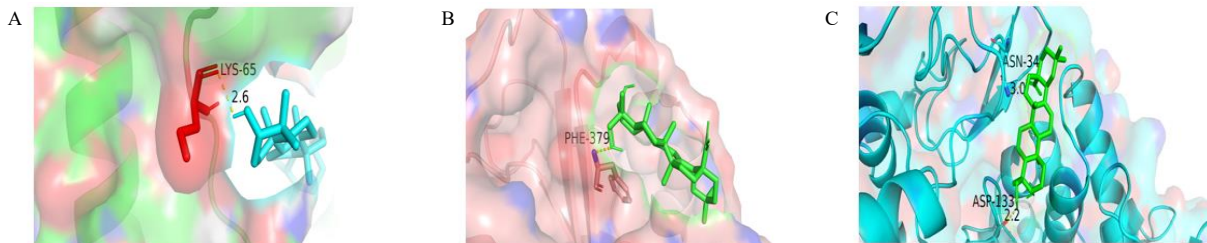


图 3 HD 与 IL-6 (A)、CDC25A (B) 和 PTGS2 (C) 蛋白的结合位点

Fig. 3 Binding sites of HD with IL-6 (A), CDC25A (B) and PTGS2 (C) proteins

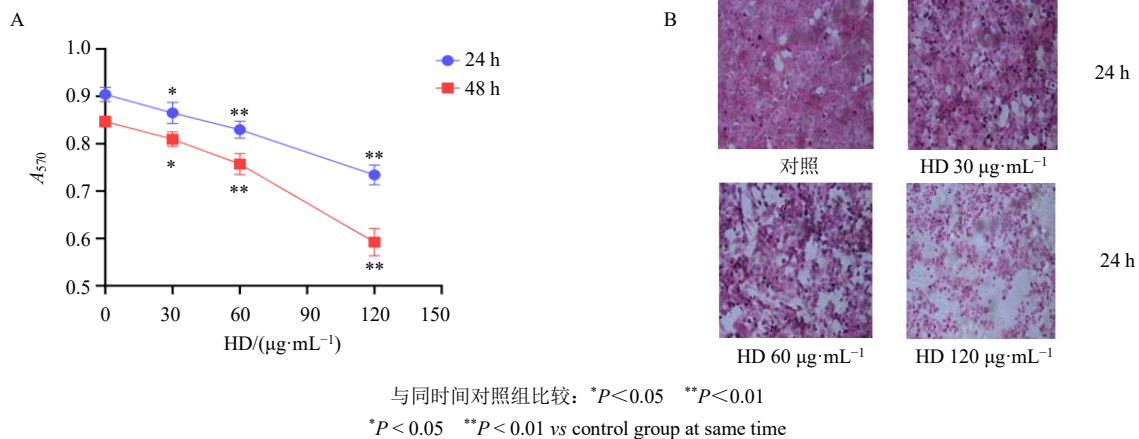
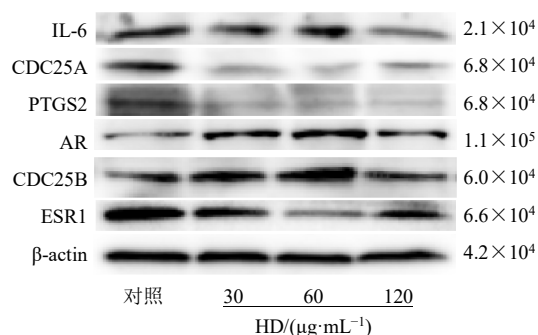


图 4 HD 对 HepG2 细胞增殖 (A) 和细胞形态 (B) 的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of HD on proliferation (A) and morphology of HepG2 cells (HE, $\times 200$)

3.2.2 HD对HepG2细胞IL-6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B和ESR1蛋白表达的影响 通过对HD/肝癌交集基因的PPI网络进行分析,确定IL-6、AR、ESR1和PTGS2为核心靶点。同时,细胞周期调控因子CDC25A和CDC25B在HD/肝癌交集基因中,考虑到它们的重要性,本研究将其纳入分析,推测HD可能通过作用于IL-6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B和ESR1,从而发挥抗肝癌的作用。为了证实分析的正确性,通过体外培养HepG2细胞,应用Western blotting法检测HD(30、60、120 μg/mL)干预后HepG2细胞内IL-6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B和ESR1蛋白表达情况。如图5所示,与对照组比较,各给药组HepG2细胞IL-6、CDC25A、ESR1和PTGS2蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$),HD(30、60 μg/mL)组AR蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),HD(60 μg/mL)组CDC25B蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$, 图6同
** $P < 0.01$ vs control group, same as Fig. 6

图5 HD对HepG2细胞IL-6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B和ESR1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of HD on expressions of IL-6, CDC25A, PTGS2, AR, CDC25B and ESR1 proteins in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

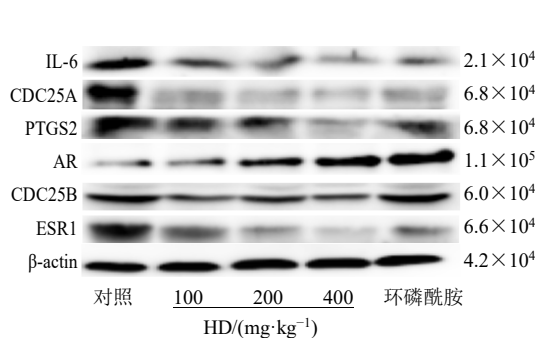
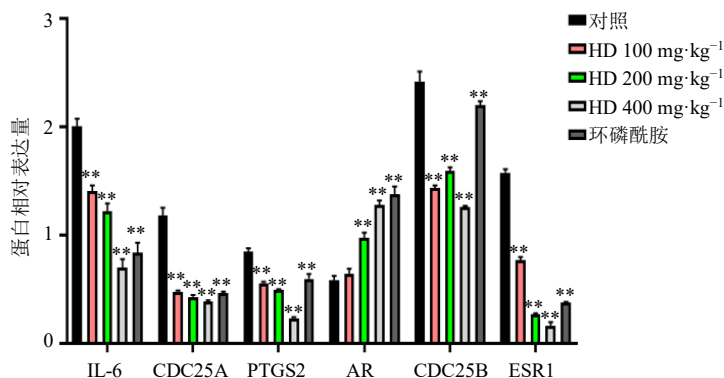
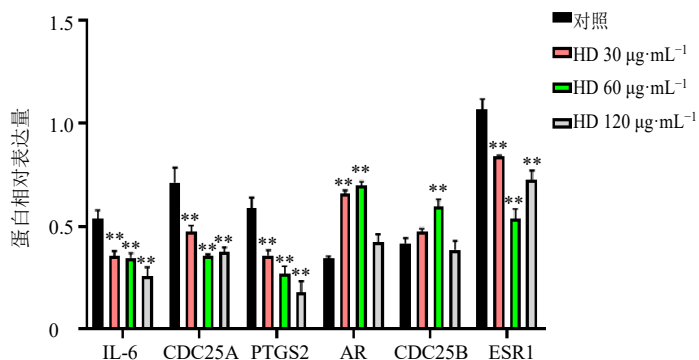


图6 HD对H₂₂荷瘤小鼠瘤体IL6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B和ESR1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of HD on expressions of IL-6, CDC25A, PTGS2, AR, CDC25B and ESR1 proteins in tumor of H₂₂ tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2.3 HD对H₂₂荷瘤小鼠瘤体IL-6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B和ESR1蛋白表达的影响 本课题组前期通过构建H₂₂荷瘤小鼠模型,应用HE染色分析了HD对H₂₂荷瘤小鼠肝脏和肾脏组织形态学的影响。结果表明,HD对小鼠肝脏和肾脏无明显毒副作用。此外,本课题组还分析了HD对H₂₂荷瘤小鼠肿瘤组织的形态学影响,结果表明,与对照组相比,经HD治疗的小鼠肿瘤细胞团块中央出现大面积坏死灶,伴有炎性细胞浸润,肿瘤细胞数明显减少,同时部分肿瘤细胞出现了核固缩、破裂和溶解的现象^[7]。因此,本研究将对对照组、HD组和环磷酰胺组的H₂₂荷瘤小鼠瘤体组织纳入分析,采用Western blotting检测各组H₂₂荷瘤小鼠瘤体中IL-6、CDC25A、PTGS2、AR、CDC25B和ESR1蛋白表达。如图6所示,与对照组相比,各给药组IL-6、CDC25A、PTGS2、CDC25B和ESR1蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$),HD(200、400 mg/kg)组和环磷酰胺组AR蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。



4 讨论

全世界每年大约有 84 万肝癌新发病例、78 万人死于肝癌,患者 5 年平均生存率不到 10%^[8]。手术切除、肝移植、局部应用放疗以及综合治疗是肝癌的主要治疗方案^[9]。但由于肝癌发病的隐匿性和缺乏特异的早期标志物,导致大多数患者往往被诊断为肝癌晚期,不适合手术治疗,生存时间一般只有 6 个月^[10]。由此可见,迫切需要开发一种靶向性强的、毒性小和不良反应少的抗肝癌药物以提高肝癌患者生存率。在前期研究中,本课题组通过体内和体外 2 个途径证明 HD 具有明显的抗肝癌作用,但具体机制尚不明确。因此,在前期工作基础上,本研究应用生物信息学与实验相结合的方法,进一步揭示 HD 抗肝癌的作用机制。

本研究应用生物信息学手段,通过对 HD/肝癌交集基因进行 PPI 分析,发现 CDC25A、IL-6 和 PTGS2 为 HD 潜在靶点。CDC25A 是一种双特异性蛋白磷酸酶,是最关键的细胞周期调节剂之一,能够清除周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependent kinases, CDKs) 如 CDK2、CDK4 和 CDK6 等的抑制性磷酸化,并对 CDKs 的活性进行正向调节,从而影响细胞周期的进展^[11]。CDC25A 在肿瘤细胞的周期、凋亡、代谢和转移中起关键作用^[12-14]。过表达的 CDC25A 与肿瘤相关因子 [如核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、信号转导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、中心体相关激酶 2 (NIMA related kinase 2, NEK2)、丙酮酸激酶 M1 (pyruvate kinase isozymes M1, PKM1) 和叉头框转录因子 1 (Forkhead box O1, FOXO1)] 相互作用,共同促进了肿瘤的进展^[15-17]。此外, CDC25A 在肝癌中高表达,与肝癌患者门静脉血栓形成、肝外转移和肝癌分化程度等临床病理参数呈正相关^[18]。IL-6 是典型的促肿瘤细胞因子,调节 STAT3 介导的多种致癌过程^[19-21]。IL-6 能够增强与细胞周期和细胞生存相关基因的转录诱导,如 G₁/S 特异性细胞周期蛋白 D1 (G₁/S-specific cyclin-D1, Cyclin D1)、原癌基因 MYC、细胞凋亡抑制剂 survivin (baculoviral IAP repeat containing 5, BIRC5)^[22-24]。此外, IL-6 还可促进与肿瘤细胞侵袭和转移相关基因的转录诱导,如低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、基质金属蛋白酶 2/7/9 (matrix metalloproteinase 2/7/9, MMP2/7/9) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth

factor, VEGF)^[25]。研究发现,癌细胞具有以下功能:生长信号自给自足、对生长抑制信号不敏感、逃避细胞程序性死亡、无限复制潜力、持续血管生成以及组织侵袭和转移^[26]。事实上,抑制 PTGS2 蛋白的表达已被证明干扰了这些功能中的大部分,这为治疗多种恶性肿瘤提供了一种很有前途的方法^[27-29]。此外,在绝大多数关于 PTGS2 抑制剂对肝癌细胞影响的体外研究中,发现使用 PTGS2 抑制剂处理后,肝癌细胞存活率均显著降低^[30-33]。因此,考虑到 CDC25A、IL-6 和 PTGS2 在肝癌发生和发展中的重要性,推测 HD 可能主要通过作用于 CDC25A、IL-6 和 PTGS2,从而起到抗肝癌的作用。从分子生物学角度,本研究通过体内外途径检测了 HD 对 CDC25A、IL-6 和 PTGS2 蛋白表达的影响。结果表明,与对照组相比,HD 组 CDC25A、IL-6 和 PTGS2 蛋白表达水平均显著降低。提示 HD 可能通过调控 CDC25A 蛋白表达水平,进而影响肝癌细胞的增殖周期;通过调控 IL-6 蛋白表达水平,导致肝癌细胞的侵袭和转移能力降低;调控 PTGS2 蛋白表达水平,从而影响肝癌细胞的程序性死亡,最终导致肝癌细胞的增殖受到抑制。

综上所述,本研究采用生物信息学与实验相结合的方法,发现 HD 可能主要通过作用于 CDC25A、IL-6 和 PTGS2,从而起到抗肝癌的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [2] Huo T I, Wu J C, Hsia C Y, et al. Hepatitis C virus infection is a risk factor for tumor recurrence after resection of small hepatocellular carcinomas [J]. *World J Surg*, 2004, 28(8): 787-791.
- [3] Yang J D, Hainaut P, Gores G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: Trends, risk, prevention and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.
- [4] Rodríguez-Hernández D, Demuner A J, Barbosa L C, et al. Hederagenin as a triterpene template for the development of new antitumor compounds [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 105: 57-62.
- [5] Lee C W, Park S M, Zhao R J, et al. Hederagenin, a major component of *Clematis mandshurica* Ruprecht root, attenuates inflammatory responses in RAW264.7 cells and in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 528-537.
- [6] Lu S H, Guan J H, Huang Y L, et al. Experimental study of antiatherosclerosis effects with hederagenin in rats [J].

- Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 456354.
- [7] 白雪. 常春藤皂甙元抗肝癌作用研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [8] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [9] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [10] Hollebecque A, Malka D, Ferte C, *et al.* Systemic treatment of advanced hepatocellular carcinoma: From disillusion to new horizons [J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(3): 327-339.
- [11] Ditano J P, Sakurikar N, Eastman A. Activation of CDC25A phosphatase is limited by CDK2/cyclin A-mediated feedback inhibition [J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(13): 1308-1319.
- [12] Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. Activation of the phosphatase activity of human CDC25A by a CDK2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition [J]. *EMBO J*, 1994, 13(18): 4302-4310.
- [13] Lu X X, Sun W, Tang Y P, *et al.* Identification of key genes in hepatocellular carcinoma and validation of the candidate gene, CDC25a, using gene set enrichment analysis, meta-analysis and cross-species comparison [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1172-1178.
- [14] Wang Z, Kar S, Carr B I. CDC25A protein phosphatase: A therapeutic target for liver cancer therapies [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(8): 863-871.
- [15] Zou X, Tsutsui T, Ray D, *et al.* The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(14): 4818-4828.
- [16] Liang J, Cao R X, Zhang Y J, *et al.* PKM2 dephosphorylation by CDC25A promotes the Warburg effect and tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12431.
- [17] Feng X L, Wu Z J, Wu Y S, *et al.* CDC25A regulates matrix metalloprotease 1 through Foxo1 and mediates metastasis of breast cancer cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(16): 3457-3471.
- [18] Wang X Q, Zhu Y Q, Lui K S, *et al.* Aberrant polo-like kinase 1-CDC25A pathway in metastatic hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 6813-6820.
- [19] Johnson D E, O'Keefe R A, Grandis J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4): 234-248.
- [20] Jenkins B J. Transcriptional regulation of pattern recognition receptors by Jak/STAT signaling, and the implications for disease pathogenesis [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(10): 750-758.
- [21] Ernst M, Jenkins B J. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130 [J]. *Trends Genet*, 2004, 20(1): 23-32.
- [22] Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, *et al.* Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer [J]. *Blood*, 2007, 110(4): 1330-1333.
- [23] Yu L, Wu D, Gao H, *et al.* Clinical utility of a STAT3-regulated miRNA-200 family signature with prognostic potential in early gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(6): 1459-1472.
- [24] Jenkins B J, Grail D, Nheu T, *et al.* Hyperactivation of STAT3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling [J]. *Nat Med*, 2005, 11(8): 845-852.
- [25] Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1): 54-74.
- [26] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [27] Crosby C G, DuBois R N. The cyclooxygenase-2 pathway as a target for treatment or prevention of cancer [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2003, 8(1): 1-7.
- [28] Dannenberg A J, Altorki N K, Boyle J O, *et al.* Cyclooxygenase 2: A pharmacological target for the prevention of cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9): 544-551.
- [29] Evans J F, Kargman S L. Cancer and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(6): 627-634.
- [30] Foderà D, D'Alessandro N, Cusimano A, *et al.* Induction of apoptosis and inhibition of cell growth in human hepatocellular carcinoma cells by COX-2 inhibitors [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1028: 440-449.
- [31] Hu K Q, Yu C H, Mineyama Y, *et al.* Inhibited proliferation of cyclooxygenase-2 expressing human hepatoma cells by NS-398, a selective COX-2 inhibitor [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(4): 757-763.
- [32] Leng J, Han C, Demetris A J, *et al.* Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: Evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis [J]. *Hepatology*, 2003, 38(3): 756-768.
- [33] Park J W, Park J E, Lee J A, *et al.* Cyclooxygenase-2 (COX-2) is directly involved but not decisive in proliferation of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132(3): 184-192.

[责任编辑 李亚楠]